REPLIZIERENDE DNA MIT ERHÖHTER NITROCELLULOSE-AFFINITÄT AUS EHRLICH-ASCITESZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Stephan Jenke
aus Hindenburg

1974

74 228

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0078

REPLIZIERENDE DNA MIT ERHÖHTER NITROCELLULOSE–AFFINITÄT AUS EHRLICH–ASCITESZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Stephan Jenke
aus Hindenburg

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 05. 1974
Dekan: Professor Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Probst
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Guglielmi

Inhaltsübersicht

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Zellmaterial	3
2.2.	Markierung der DNA	3
2.2.1.	Kurzzeit-"Puls"-Markierung	3
2.2.2.	"Puls-Chase"-Markierung	4
2.2.3.	Langzeit-Markierung	4
2.3.	DNA-Isolierungs-Methoden	5
2.3.1.	Standard-Methode nach Paoletti et al.(16)	5
2.3.2.	Methode nach Sato et al.(8)	5
2.3.3.	Kombinierte Methode	6
2.3.4.	Schonende DNA-Isolierung aus Kernen	6
2.4.	Nitrocellulose-Chromatographie	7
2.5.	Sephadex-Chromatographie	8
2.6.	Hydroxyapatit-Chromatographie	8
2.7.	Isopyknische CsCl- und Cs_2SO_4-Zentrifugation	9
2.8.	Zonen-Zentrifugation	9
2.9.	Messung der Radioaktivität	1o
2.1o.	Kryolyse	1o
2.11.	Beschallung der isolierten DNA	1o
2.12.	Endonuclease-Behandlung	11
2.13.	Sonstige Methoden	11
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Natur des Bindungsortes	12
3.1.1.	Sekundärstruktur	12
3.1.1.1.	Auswirkungen verschiedener DNA-Isolierungs-Methoden auf die Sekundärstruktur des neusynthetisierten Anteils	12
3.1.1.2.	Untersuchungen an fragmentierter DNA	17
3.1.2.	Untersuchungen über eine eventuelle RNA-Beteiligung an der DNA-Replikation	33

		Seite
3.2.	Lage des die Nitrocellulose-Affinität verursachenden Bereiches relativ zum Replikationspunkt	42
3.2.1.	Einbau radioaktiven Präkursors in die DNA in Abhängigkeit von der Zeit bei sogenannten "Puls"- und "Puls-Chase"-Experimenten	42
3.2.2.	Abhängigkeit des an die Nitrocellulose bindenden Anteils der Markierung von der Größe der sogenannten "Puls"- und "Puls-Chase"-DNA	45
3.2.3.	Abhängigkeit des an Nitrocellulose bindenden Anteils der "Puls"-Markierung von der Länge der "Chase"-Zeit	52
4.	Diskussion	54
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literatur	62

In dieser Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

TCA	:Trichloressigsäure
SDS	:Natrium-Dodecyl-Sulfat
DNA	:Desoxyribonukleinsäure
RNA	:Ribonukleinsäure
EDTA	:Äthylendiamintetraessigsäure
Upm	:Umdrehung pro Minute
Ipm	:Impulse pro Minute
TES	:(Tris-EDTA-Saline) o,4 M NaCl; o,oo1 M EDTA; o,o5 M Tris/HCl pH 6.75 Die Zahl vor den Buchstaben TES gibt den Gehalt des Puffers an NaCl an, der variieren kann.

1.
Einleitung und Fragestellung

Bis zum heutigen Tag ist der genaue molekulare Mechanismus der DNA-Replikation in Säugetierzellen noch nicht geklärt. Fest steht, daß verschiedene mit besonderen chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften behaftete Zwischenstufen auftreten (1,2,3). Probst et al. (5) gelang es, neusynthetisierte DNA von der allgemeinen Zell-DNA über Nitrocellulose-Chromatographie abzutrennen. Im Gegensatz zur allgemeinen Zell-DNA wird nämlich neusynthetisierte DNA bei höherer Jonenstärke und neutralem pH an Nitrocellulose adsorbiert. Durch Elution mit einer 0,5% Natrium-Dodecyl-Sulfat-Lösung kann man unter nicht denaturierenden Bedingungen diese DNA zum größten Teil wiedergewinnen. Damit steht neusynthetisierte DNA in ausreichenden Mengen für weitere Untersuchungen, unter anderem zur Ermittlung des Grundes für erhöhte Nitrocellulose-Affinität, zur Verfügung.
Schon seit längerem wird in der Literatur die Frage diskutiert, ob die DNA-Replikations-Zwischenstufen doppel- oder einsträngig sind, oder ob sie zumindest einsträngige Bereiche besitzen. Oishi (3) vermutete bei seinem "second intermediate" von B. subtilis einsträngige Bereiche, obwohl es sich an Hydroxyapatit wie Doppelstrang-DNA verhielt. Er schloß aber gerade auf Grund der Nitrocellulose-Affinität und aus dem Verhalten in der isopyknischen Cs_2SO_4/Hg(II)-Zentrifugation auf die Beteiligung einsträngiger Anteile. Ähnliche Beobachtungen machten Painter und Schäfer (6) an HeLa-Zellen sowie Berger und Irvin (7) an regenerierenden Rattenleberzellen. Vor kurzem berichtete Sato (8) über eine fast vollständige Einsträngigkeit der über Nitrocellulose gewonnenen, neusynthetisierten DNA. Probst und Jenke (5,26) konnten jedoch diese Ergebnisse nicht bestätigen. Sowohl die Hydroxyapatit-Chromatographie wie die isopyknische CsCl- und Cs_2SO_4-Zentrifugation ließen keinerlei Schluß

auf Einsträngigkeit zu, so daß eine zusätzliche, für die Nitrocellulose-Affinität verantwortliche Komponente diskutiert wurde. Zudem wurde von Habener et al. (15) gezeigt, daß neusynthetisierte Säugetierzell-DNA in vivo in einem destabilisierten Zustand vorliegt. Sie kann bei Anwendung bestimmter DNA-Isolierungsverfahren in einsträngiger Form isoliert werden, während sie, nach anderen Methoden isoliert, kaum einsträngigen Charakter zeigt.

Nach den ersten Veröffentlichungen über eine RNA-Beteiligung an der DNA-Synthese bei Viren (9,10) und Bakterien (11,12) erschienen auch Berichte über eine "Primer"-Funktion der RNA bei der DNA-Replikation in Säugetierzellen (13,14,25). Aus den Erfahrungen, die über das Verhalten künstlich erzeugter DNA/RNA-Hybride an Membranfiltern bestehen, war es zunächst nicht auszuschließen, daß die Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA durch einen Gehalt an RNA zustande kommt.

Die vorliegende Arbeit sollte Aufschluß über die Lokalisation in Bezug auf den Replikationspunkt sowie die chemische Natur und Struktur des die erhöhte Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA verursachenden Bereiches geben. Dabei wurde folgendes Grundkonzept verfolgt: DNA sollte nach verschiedenen Methoden gewonnen, und der Einfluß der Isolierungsmethode auf die Sekundärstruktur des neusynthetisierten Anteils untersucht werden. Dann sollte die Nitrocellulose bindende DNA kontrolliert abgebaut (Ultraschall, Enzyme) und dann einer Analyse durch Zonensedimentation, isopyknische Zentrifugation und Hydroxyapatit-Chromatographie unterworfen werden. Sogenannte "Puls-Chase"-Experimente (nach Entfernung des radioaktiven Präkursors läßt man die DNA-Synthese weiterlaufen) sollten schließlich Auskunft über die Lebensdauer des an Nitrocellulose bindenden Bereiches neusynthetisierter DNA geben.

2.
Material und Methoden

2.1.
Zellmaterial

Die Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen stammten ursprünglich von Dr. Karzel (23), Pharmakologisches Institut der Universität Bonn. Sie können in vivo oder als permanente Suspensionskultur gezüchtet werden. Es bereitet keine Schwierigkeiten, die Zellen von der Maus in die Kultur und umgekehrt zu überimpfen. Das Überimpfen von Maus zu Maus erfolgt durch i.p. Injektion von 0,2 ml (ca. 3×10^7 Zellen) Ascites, der aus einer unmittelbar vorher getöteten Maus 7 Tage nach deren Inokulation entnommen wurde. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nur Ascites-Zellen verwendet, die in vivo in NMRI-HAN Mäusen (weibl., 18-20 g) gewachsen waren. Für alle Versuche wurden Mäuse mit einem vier Tage alten Ascites verwendet; (Tag des Überimpfens = nullter Tag). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Zellen in der log. Wachstumsphase.

2.2.
Markierung der DNA

2.2.1.
Kurzzeit- ("Puls"-)Markierung

Bei der Kurzzeit-Markierung der neusynthetisierten DNA wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und ihre Bauchhaut vorsichtig mit zwei Pinzetten aufgerissen. Aus der noch geschlossenen Bauchhöhle wurde nach Injektion von vorgewärmtem (37° C) Kulturmedium (24), das 5 USP-Einheiten Heparin (Liquemin, Roche) pro ml enthielt, die Ascites-Flüssigkeit entnommen und in ein vorgewärmtes, mit 150 µCi ^{3}H-Thymidin (Thymidin-Methyl-^{3}H, spez. Akt. 43 Ci/mM, Radiochemical Centre Amersham, England) beschicktes Reagenzglas überführt.

Außerdem war NaCl zu einer Endkonzentration von 0,9% zugegeben. Nach einer Minute wurde der Einbau von Radioaktivität durch Überführen des Inkubationsansatzes in 100 ml eiskalte Hanks-Lösung gestoppt. Vor der anschließenden DNA-Isolierung wurden die Zellen noch dreimal mit eiskalter Hanks-Lösung durch Zentrifugation (5 min., 500 x g) und Resuspendieren gewaschen.
Wird länger als 4 min. inkubiert, so überführt man die der Maus entnommene Medium-Ascites-Mischung in soviel vorgewärmtes Kulturmedium, daß die Zellkonzentration ca. 5×10^6 Zellen/ml beträgt. Die für den Einbau optimale ^{3}H-Thymidin-Konzentration liegt nach (17) bei $2\text{-}3 \times 10^{-7}$ M. Nach Ende der Inkubationszeit wird wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.2.2.
"Puls-Chase"-Markierung

Für die "Puls-Chase"-Markierung wurden die Zellen nach dem 1-minütigen "Puls" 100fach mit warmem (37° C) Kulturmedium, das 10^{-5} M nicht radioaktives Thymidin enthielt, verdünnt und weiter bei 37° C inkubiert. Ernten und Waschen der Zellen nach der gewünschten Inkubationszeit geschah wie unter 2.2.1. beschrieben.

2.2.3.
Langzeit-Markierung

Um gleichmäßig durchmarkierte DNA zu erhalten, wurden die Zellen in vitro für 40 Stunden (ca. 2 Zellzyklen) mit ^{14}C-Thymidin (Thymidin-2-^{14}C, spez. Akt. 56 mCi/mM; Radiochemical Centre, Amersham, England) inkubiert. Dazu wurde Ascites-Suspension bis zu einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro ml in warmes Kulturmedium, das 0,1 µCi/ml ^{14}C-Thymidin (Anfangskonzentration) enthielt, eingesät. Während der 40-stündigen Inkubationszeit wurde durch Zugabe von frischem Medium die Zellkonzentration zwischen 4-6 x 10^5 Zellen/ml gehalten. Beim Ernten und Waschen verfuhr man wie oben.

2.3.
DNA-Isolierungsmethoden

2.3.1.
Standardmethode nach Paoletti et al. (16)

Ca. 2 x 10^8 gewaschene Zellen wurden in 10 ml Citrat-Puffer (0,14 M NaCl; 0,05 M Na_3-Citrat, Merck, p.a.) suspendiert, 4 sec. mit dem Ultra-Turrax TP 18/2 (Jahnke & Kunkel, Freiburg i. Br., Germany) homogenisiert und nach Zugabe von 5 ml Citrat-Puffer 10 min. bei 10 000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch dreimal genau gleich behandelt. Den letzten Rückstand konnte man über Nacht bei -20° C aufbewahren. Nach dem Auftauen wurde wieder mit 10 ml Citrat-Puffer resuspendiert, homogenisiert und mit weiteren 5 ml Citrat-Puffer versetzt. Unter guter Durchmischung ließ man 5 ml Phenollösung pH 9 (9 Teile frisch über N_2 destillierten Phenols werden mit 1 Teil 10^{-3} M EDTA gemischt und bis pH 9 mit konzentrierter KOH versetzt) dazulaufen und schüttelte diese Mischung 60 min bei Zimmertemperatur mäßig stark an einer Schüttelmaschine. Nach anschließender, halbstündiger Zentrifugation (10 000 x g, 0° C) der milchigen Suspension wurde die obere, wässrige Phase abgehebert und erneut mit 5 ml Phenollösung pH 9 versetzt. Es schloß sich eine zweite Schüttelperiode, diesmal nur 30 min., und eine zweite Zentrifugation an. Die erneut abgeheberte wässrige Phase wurde dann gegen 0,4 TES (0,4 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,05 M Tris/HCl pH 6,75) phenolfrei dialysiert.

2.3.2.
Methode nach Sato et al. (8)

Ascites-Tumor-Zellen wurden in destilliertem Wasser bis zu einer Konzentration von 5 x 10^6 Zellen/ml suspendiert, mit dem gleichen Volumen 2% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in 2 mM EDTA gemischt und 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Zufügen eines gleichen Volumens 4 M NaCl wurde die

Mischung 20 min bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand gegen 0,4 TES dialysiert.

2.3.3.
Kombinierte Methode

Hierbei wurde genau wie bei 2.3.2. verfahren, nur daß der letzte Überstand gegen 0,05 M Na_3-Citrat; 0,14 M NaCl; pH 7,6 zur Entfernung des SDS dialysiert wurde. Dann wurde 1/3 Volumen Phenollösung pH 9, wie unter 2.3.1. beschrieben, zugegeben, 40 min. geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (10 000 x g, 30 min.). Die wässrige Phase wurde zur Entfernung des Phenols gegen 0,4 TES dialysiert.

2.3.4.
Schonende DNA-Isolierung aus Kernen

Die gewaschenen Ascites-Tumor-Zellen wurden mit soviel 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,24 M Rohrzucker; 1% Triton-X-100 (Serva, Heidelberg, Germany) versetzt, daß die Zellkonzentration ca. 10^7 Zellen/ml betrug. Nach 15-minütiger Detergenseinwirkung im Eisbad wurde diese Mischung 90 sec. mit dem Ultra-Turrax (110 V) behandelt und abzentrifugiert (1 500 x g; 5 min.). Das rohe Kernsediment wurde in wenig 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,24 M Rohrzucker suspendiert und mit soviel 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 2,4 M Rohrzucker versetzt, daß die Rohrzuckerkonzentration 2,1 M betrug. Diese Suspension wurde mit 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 2,25 M Rohrzucker unterschichtet und 70 min. im SW 25,1 Rotor bei 25 000 Upm und 2-3° C in der Ultrazentrifuge L 265 B der Firma Beckman, Palo Alto, Calif. zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die reinen Kerne. Diese wurden mit 0,1 M NaCl; 0,05 M Tris/HCl pH 7,6 rohrzuckerfrei gewaschen, in 0,01 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,01 M Tris/HCl pH 7,6 bis zu einer Konzentration von 3 x 10^7 Zellen /ml suspendiert und durch Einstellen der Lösung auf eine SDS-Konzentration von 0,5% lysiert. Es folgten eine 1-stündige RNAase-Behandlung (50 µg/ml) bei

30° C, eine 4-stündige Pronase-Benandlung (100 mg/10^{9} Zellen) bei 37°C und eine anschließende 10-stündige Dialyse gegen 0,1 M NaCl; 0,01 M EDTA; 0,01 M Tris/HCl pH 7,6. Die dialysierten DNA-Lösungen wurden mit festem CsCl bis zu einer Dichte von 1,69 g/cm^3 versetzt. Portionen von 8 ml wurden mit Paraffinöl überschichtet und für 50 h bei 25° C und 45 000 Upm im Ti 50-Rotor zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte durch den Boden der Polyallomerröhrchen (Fraktionsgröße: 0,5 ml). Zum Schluß wurdendie DNA-haltigen Fraktionen vereinigt und gegen 0,4 TES dialysiert.

2.4.
Nitrocellulose-Chrmatographie

Zur Verwendung in der Chromatographie mußte die Nitrocellulose (NitroCel S p.a., Serva, Heidelberg) vom Methanol und kleinen Partikeln befreit werden. Hierzu wurde sie in destilliertem Wasser (2 Ltr/15 g) 10 min. heftig gerührt. Nach Absitzen des gröberen Materials wurde der Überstand abgegossen. Nach drei derartigen Reinigungsschritten und einem letzten Waschgang auf dem Büchner-Trichter wurde das Material resuspendiert und durch Evakuieren entgast.
Die Nitrocellulose wurde mit Hilfe eines Glasstabs in den mit Wasser gefüllten Säulen verschiedener Größe (es wurden 2 ml, 5 ml und 20 ml Einmalspritzen verwandt) festgestopft und dann mit Startpuffer (0,4 TES = 0,4 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,05 M Tris/HCl pH 6,75) äquilibriert. Bei einer 2 ml Säule wurde die im Startpuffer gelöste DNA mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/10 min aufgetragen. Bei größeren Säulen lag die Geschwindigkeit entsprechend dem Säulenquerschnitt höher. Die Kapazität einer 2 ml Säule

---

+ Serva, Heidelberg, Germany

++ Pronase P, 45 000 PUK/g, Serva, Heidelberg, Germany
RNAase aus Rinderpankreas, 45 E/mg, Serva, Heidelberg, Germany

betrug ca. 0,5-1 mg DNA, entsprechend mehr bei den anderen Säulenvolumina. Mit jeweils dreifachem Säulenvolumen wurde nun mit Startpuffer (Eluat I = TES-Fraktion), mit 0,5% SDS enthaltendem Startpuffer (Eluat II = SDS-Fraktion) und mit 0,1 M NaOH (Eluat III = NaOH-Fraktion) nachgewaschen. Teils wurden die Eluate als Gesamtfraktion gesammelt, teils wurde zur Vermeidung unnötiger Verdünnung des Materials ein Fraktionssammler benutzt. Zur Entfernung von im Eluat II enthaltenen Nitrocellulose-Partikeln wurde im Ti 50-Rotor 30 min. bei 35 000 Upm und 25° C zentrifugiert.

2.5.
Sephadex-Chromatographie

Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde in 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,05 M Tris/HCl pH 6,75 mindestens 10 h bei Zimmertemperatur quellen gelassen, entgast und in eine 50 cm lange Säule (Durchmesser 2 cm) gefüllt. Nach Äquilibrieren mit oben genanntem Startpuffer und Auftragen der DNA-Lösungen (ca. 10 ml je Säule) wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/4 min. unter Verwendung eines Fraktionssammlers eluiert. Nach Bestimmung der Radioaktivität aus Anteilen der Fraktionen wurden die DNA-haltigen Fraktionen vereinigt.

2.6.
Hydroxyapatit-Chromatographie

Der Hydroxyapatit wurde nach Bernardi (35) hergestellt. Auf 1 ml Säulenfüllung kann eine Lösung mit einem DNA-Gehalt bis zu 100 µg Nukleinsäure aufgetragen werden. Die Elution erfolgte nach Vorwaschen der beladenen Säule mit 1-2 Säulenvolumina 0,04 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 durch einen linearen Gradienten zwischen den Grenzpuffern 0,04 M Kaliumphosphat, pH 7,0 und 0,4 M Kaliumphosphat, pH 7,0 bei Zimmertemperatur. Für eine 5 ml-Säule betrug das Gesamtvolumen des linearen Gradienten 35 ml. Die Chro-

matographie wurde mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/4 min an einem Fraktionssammler durchgeführt. Vor dem Auftragen wurde die DNA gegen 0,04 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 dialysiert.

2.7.
Isopyknische CsCl- und Cs_2SO_4-Zentrifugation

Für die isopyknische CsCl-Zentrifugation im 50 Ti-Rotor wurden die die neusynthetisierte DNA enthaltenden Lösungen - Eluate II der Nitrocellulose-Chromatographie - gegen 0,15 M NaCl; 0,015 M Na_3-Citrat (SSC) dialysiert und mit CsCl (Merck, suprapur) bis zu einer Dichte von 1,69 g/cm^3 versetzt. Portionen von 8 ml wurden mit Paraffinöl überschichtet und bei 45 000 Upm und 25° C ca. 50 h im 50 Ti- Rotor zentrifugiert. 0,2 ml Fraktionen wurden vom Boden des Röhrchens her gesammelt und auf ihre Radioaktivität und Dichte analysiert.
Bei der Cs_2SO_4-Zentrifugation im SW 50 L Rotor wurde nach Okazaki (11) verfahren.
Für die CsCl- bzw. Cs_2SO_4-Zentrifugation im 60 Ti-Rotor wurden die über Sephadex G-50 von SDS befreiten DNA-Lösungen mit CsCl auf eine Dichte von 1,69 g/cm^3 bzw. mit Cs_2SO_4 auf eine Dichte von 1,445 g/cm^3 gebracht. Das Gesamtvolumen betrug in diesen Fällen 20 ml. Nach Einstellen der beiden Lösungen auf einen pH-Wert von 7,6 und Überschichten mit Paraffinöl wurde in einem 60 Ti-Rotor bei 25° C und 33 000 Upm ca. 50 h zentrifugiert. Beim Fraktionieren verfuhr man wie oben.

2.8.
Zonen-Zentrifugation

In allen Fällen wurde im SW 25,1-Rotor der Beckman Ultrazentrifuge L 265 B 8 h, 12 h oder 16 h bei 5° C zentrifugiert. Der neutrale (pH7,8) Rohrzuckergradient (5-20%) enthielt 0,2 M NaCl; 0,01 M Tris und 0,001 M EDTA. Die Ermittlung der s_{20w}-Werte erfolgte nach den von McEwen (27)

aufgestellten Tabellen zur Bestimmung von Sedimentationskonstanten in linearen Rohrzuckergradienten.

2.9.
Messung der Radioaktivität

Nach Chromatographie, Gradientenzentrifugation usw. erhaltene Nukleinsäurefraktionen wurden mit 50 µg alkalischer Kalbsthymus-DNA/ml Probe als Trägersubstanz gemischt, in der Kälte mit TCA bis zu einem Überschuß an freier Säure von 5% versetzt und nach 30 min. auf Membranfilter (Sartorius MF 100) gesammelt. Die Filter wurden mit kalter 1% TCA gewaschen, getrocknet und in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard-Tri-Carb, Modell 3003) in Toluol-Szintillator (5 g PPO; 0,2 g POPOP; 1000 ml Toluol) ausgezählt.

2.10.
Kryolyse

Die Methode stammt von Lysccv und Moskovsky (28). Die in 0,4 TES gelöste DNA, deren Konzentration 100 µg/ml nicht überschreiten soll, wurde in einem Schliff-Erlenmeyer aus Duran-Glas abwechselnd in einen Dewar-Behälter mit flüssiger Luft (T=-180°C) und ein Wasserbad (T=+60° C) getaucht. Die Gefrierzeit dauerte ca. 90 sec., die Auftauzeit ca. 40 sec. Die Dicke der DNA-Lösung betrug zwischen 0,5 und 0,7 mm.

2.11.
Beschallung der isolierten DNA

In speziellen Beschallungsgefäßen, die eine Umwälzung der Lösung erlauben und ein Volumen von ca. 15 ml aufnehmen können, wurde unter Kühlung (Eisbad) insgesamt 5 min. lang (10 sec. Beschallen, 40 sec. Kühlen) beschallt (Branson Sonifier, Mikrotip, Stufe 4).

2.12.
Endonuclease-Behandlung

Endonuclease aus Neurospora crassa (Boehringer, Mannheim, Germany, 500 E/mg/ml) wurde in einer 3 M $(NH_4)_2SO_4$-Suspension geliefert und erst kurz vor Gebrauch in H_2O-bidest gelöst. Zur Verdauung wurden 4 E Nuclease/10 µg DNA 2,5 h bei 37° C in einem Puffer inkubiert, der eine Endkonzentration von 0,15 M NaCl; 0,02 M $MgCl_2$; 0,15 M Tris/HCl, pH 8,0 besaß. Nach Abschluß der Inkubation wurde das Protein mit Hilfe der Phenol/pH 9-Methode (2.3.1.) entfernt und die wässrige Phase gegen 0,4 TES dialysiert.

2.13
Sonstige Methoden

Die Inkorporation von radioaktivem Thymidin in die säurelöslichen und säureunlöslichen Fraktionen von Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen wurde folgendermaßen bestimmt: Die zu den entsprechenden Zeiten entnommenen Zellproben wurden mit eiskalter Hanks-Lösung gestoppt, zweimal gewaschen und dann in einer genau bekannten Menge 5% TCA suspendiert. Nach 30-minütigem Stehen im Eisbad und anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 x g in der Kälte wurden Sediment und Überstand getrennt. Ersteres wurde in 5% TCA suspendiert, auf Membranfilter abgesaugt, mit 1% TCA gewaschen und wie oben ausgezählt. Vom Überstand wurde ein Anteil in Triton-Szintillator (350 ml Triton-X-100; Toluol-Szintillator ad 1000 ml) ausgezählt. Die Dichte der CsCl- und Cs_2SO_4-Gradienten wurden mit einem Abbé-Refraktometer (Zeiss) bestimmt.

3.
Ergebnisse

3.1.
Natur des Bindungsortes

3.1.1.
Sekundärstruktur

3.1.1.1.
Auswirkungen verschiedener DNA-Isolierungsmethoden auf die Sekundärstruktur des neusynthetisierten Anteils

Wie eingangs erwähnt, wurden in den letzten Jahren auf die Frage, ob die neusynthetisierte DNA aus Säugetierzellen einsträngig oder doppelsträngig sei, widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Zur Lösung dieser Widersprüche boten sich die Befunde von Habener et al. (15) an. Je nach DNA-Extraktionsbedingungen konnten die Autoren neusynthetisierte DNA aus HeLa-Zellen in ein- wie in doppelsträngiger Form isolieren.
Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene DNA-Isolierungsmethoden angewandt:
Methode A (2.3.2.) ist die Methode von Sato et al. (8), die möglichst genau eingehalten wurde.
Methode C (2.3.1.) entspricht der DNA-Präparation nach Paoletti et al. (16).
Methode B (2.3.3.) stellt eine Art Hybrid zwischen A und C dar. Sie enthält sämtliche Schritte von Methode A und zusätzlich die Phenolbehandlungen von C. Von der nach den drei Methoden gewonnenen DNA wurde die Nitrocellulose-bindende Fraktion auf jeweils genau gleiche Weise (2.4.) abgetrennt und anschließend einer isopyknischen CsCl-Zentrifugation wie einer Hydroxyapatit-Chromatographie unterworfen.
Bei den die Nitrocellulose bindende Fraktion neusynthetisierter DNA charakterisierenden Experimenten wurde als Referenz-DNA langzeit-^{14}C-markierte DNA, die vorher über

eine Nitrocellulose-Säule von bindenden Komponenten befreit worden war, verwandt.

Tabelle 1 zeigt die prozentuale Radioaktivitätsverteilung der nach den verschiedenen Methoden gewonnenen DNA[+] auf die drei Fraktionen der Nitrocellulose-Chromatographie.

DNA-Isolierungs-Methode	Prozentuale Radioaktivitätsverteilung auf die Eluate I-III der Nitrocellulose-Chromatographie		
	I	II	III
Methode A	15	35	50
Methode B	17	60	23
Methode C	42	46	12

Tab.: 1

Für weitere Untersuchungen wurde die neusynthetisierte DNA durch Dialyse von SDS befreit (gegen 0,4 TES, 4 Tage lang, 3 maliger Wechsel).
Die Ergebnisse der isopyknischen CsCl-Zentrifugation und der Hydroxyapatit-Chromatographie sind in Abb. 1-3 zusammengestellt.

Abb. 1-3: Isopyknische CsCl-Zentrifugation (a) und Hydroxyapatit-Chromatographie (b) neusynthetisierter DNA aus verschiedenen DNA-Präparationen. Jede Probe wurde mit langzeit-^{14}C-markierter DNA als Referenzsubstanz versetzt. Im Falle der Abb. 3 wurde noch hitzedenaturierte ^{14}C-DNA zugefügt. Abb.1: DNA-Isolierungsmethode A; Abb.2: DNA-Isolierungsmethode B; Abb.3: DNA-Isolierungsmethode C; Symbole: -O-O- = ^{3}H-"Puls"-markierte, neusynthetisierte DNA; -Δ-Δ- = langzeit-^{14}C-markierte DNA, im Falle von Abb.3 native wie hitzedenaturierte; -□-□- = Dichte des CsCl-Gradienten; -■-■- = PO_4-Konzentration.

[+] 1-min.-"Puls"-Markierung

Abb. 1: Legende siehe Seite 13

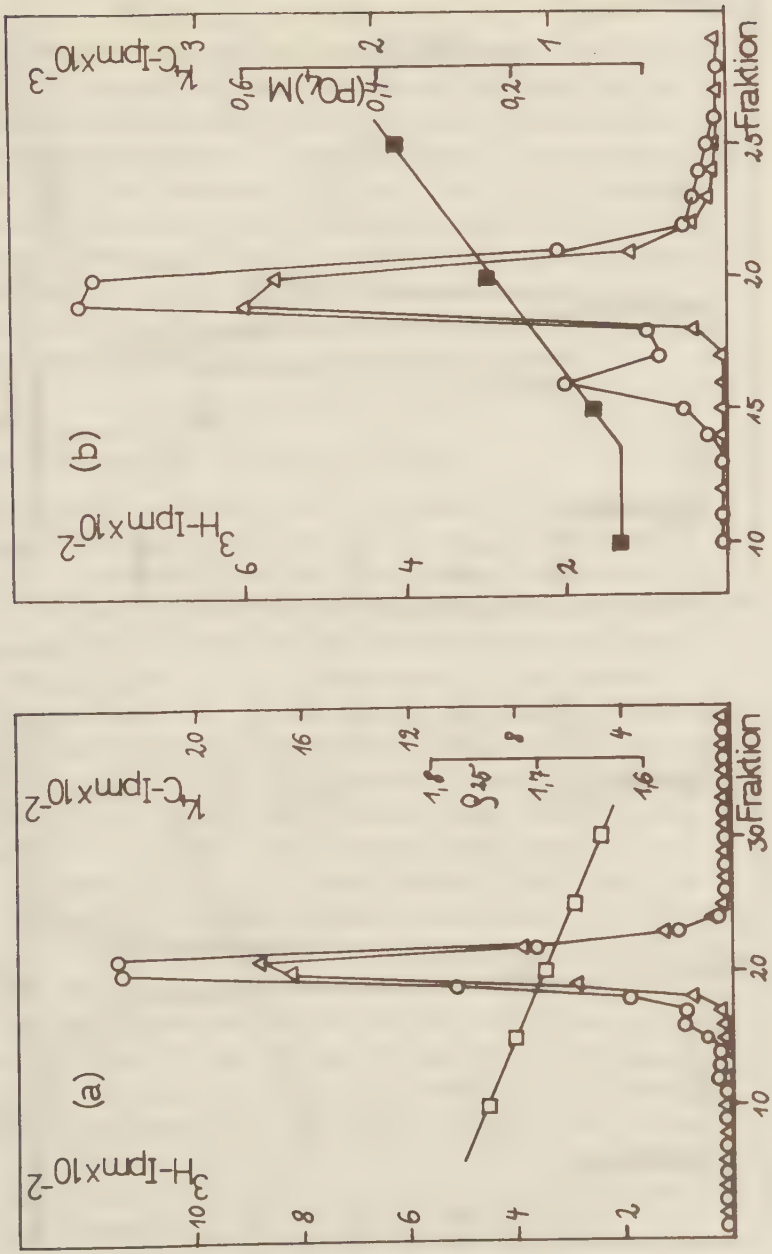


Abb. 2: Legende siehe Seite 13

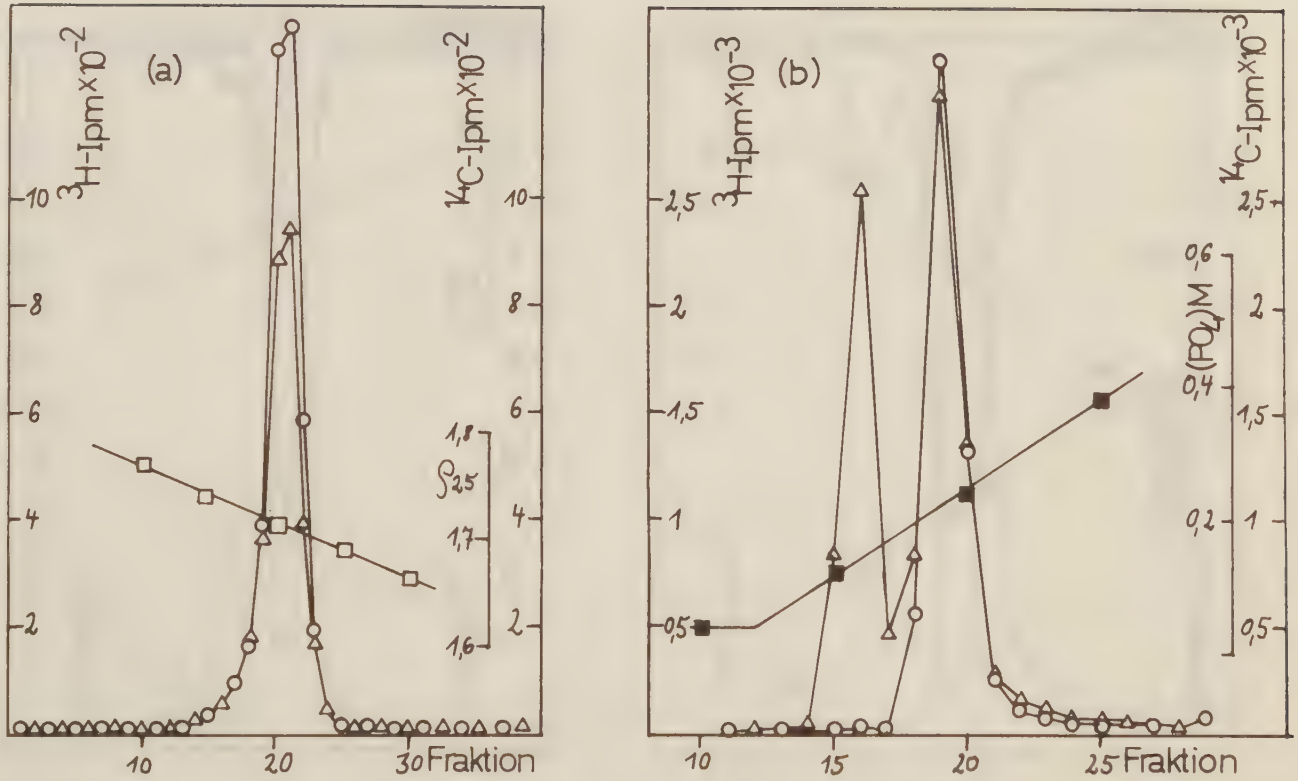


Abb. 4: Legende siehe Seite 13

Das SDS-Eluat der nach Methode C gewonnenen DNA zeigt keinerlei Einstrangbereiche, während die nach Sato et al. (8) isolierte, neureplizierte DNA eine beträchtliche Einsträngigkeit aufweist. In der Hydroxyapatit-Chromatographie wird 26,5% der Radioaktivität bei einer PO_4-Konzentration von weniger als 0,18 M eluiert. Die aus der Methode B stammende, neusynthetisierte DNA hat ebenfalls einsträngige Anteile. Daraus folgt, daß die Phenolbehandlung nicht vorrangig zu einem Verlust von Einstrangbereichen führt, wie von Sato et al. (8) vermutet wurde.

3.1.1.2.
Untersuchungen an fragmentierter DNA

Im Gegensatz zu Sato et al. (8) finden die meisten Autoren, wenn überhaupt, lediglich geringe einsträngige Anteile bzw. einen gewissen einsträngigen Charakter (3, 6,7). Es war denkbar, daß bei neusynthetisierter DNA aus den hier untersuchten Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen die einsträngigen Bereiche im Verhältnis zu den doppelsträngigen so wenig ins Gewicht fielen, daß sie weder mit der isopyknischen CsCl-Zentrifugation noch mit der Hydroxyapatit-Chromatographie nachgewiesen werden konnten. Es mußte versucht werden, die einsträngigen Bereiche anzureichern. Daher wurde die Länge der DNA-Moleküle durch extreme Beschallung um ca. das 20fache verkleinert, so daß eventuell vorhandene Einstrang-Bereiche einen relativ größeren Anteil bekamen.
Die DNA wurde in diesem Fall nach der Standard-Methode aufgearbeitet und vor der Nitrocellulose-Chromatographie beschallt. Die optimalen Inkubationsbedingungen (5×10^6 Zellen/ml und $2\text{-}3 \times 10^{-7}$ M ^{3}H-Thymidin) wurden aus (17) übernommen, die Markierungsdauer betrug 5 min. Abb. 4 zeigt ein für die Nitrocellulose-Chromatographie der nach (2.2.1. und 2.3.1.) aufgearbeiteten und nach (2.11.) beschallten DNA typisches Elutionsprofil.

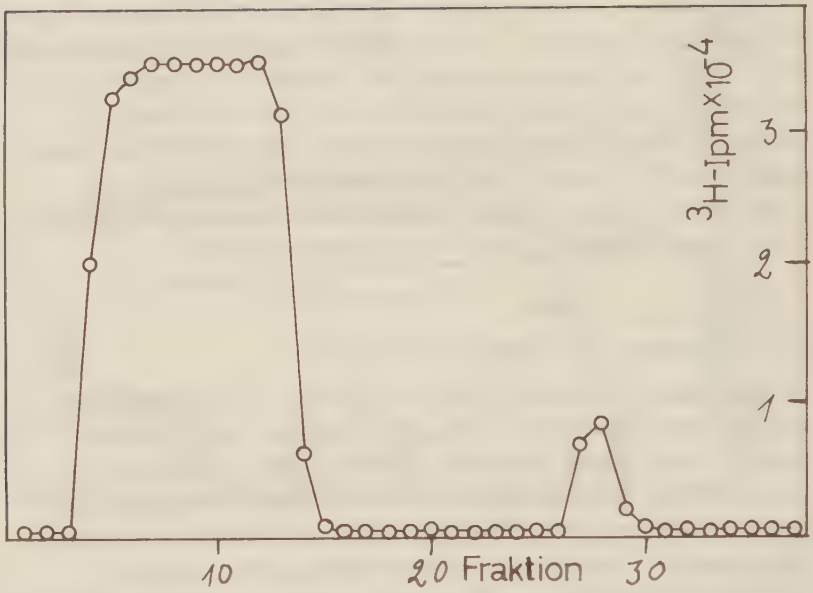


Abb. 4: Elutionsmuster der Nitrocellulose-Chromatographie kurzzeit-"Puls"-markierter, beschallter DNA. Aus 6 x 10^8 Zellen, die 5 min. mit ^{3}H-Thymidin "puls-markiert" waren (2.2.1.), wurde nach der Paoletti-pH-9-Methode (2.3.1.) 6,6 mg DNA isoliert. Nach 5-minütiger Beschallung (2.11.) wurde diese DNA in einem Gesamtvolumen von 45 ml auf eine Nitrocellulose-Säule (Bettvolumen: 20 ml) aufgetragen und entsprechend (2.4.) eluiert. Anteile der einzelnen Fraktionen wurden ausgezählt. —o—o— = ^{3}H-Ipm

Der erste Radioaktivitätsgipfel stellt die allgemeine Zell-DNA dar, die unter diesen Bedingungen praktisch keine Nitrocellulose-Affinität besitzt (Eluat I = TES-Fraktion), während der zweite mit 0,5% SDS vom Adsorbens eluiert wird (Eluat II = SDS-Fraktion). Der prozentuale Radioaktivitätsanteil der NaOH-Fraktion (Eluat III) von DNA nach einem 5-minütigen "Puls" ist so gering, daß diese Fraktion vernachlässigt werden kann.
Die vereinigten SDS-Fraktionen wurden zur Entfernung des Detergens über Sephadex G-50 chromatographiert (2.5.). In Abb. 5 ist ein solcher Reinigungsschritt dargestellt. Das SDS wird erst bei Fraktion 60 eluiert.

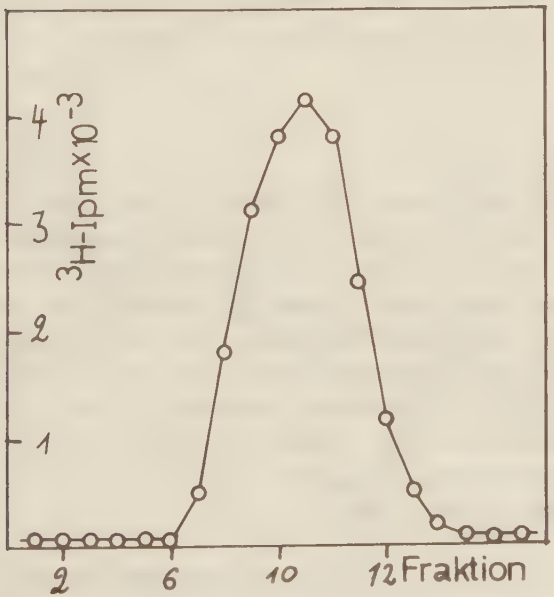


Abb. 5: Legende siehe Seite 2o

Abb. 5: Elutionsprofil einer Sephadex G-50-Säulenchromatographie zur Abtrennung des Detergens aus dem Eluat II der Nitrocellulose-Chromatographie. Eine Sephadex G-50 Säule (2 x 50 cm) wurde mit 50 µg neusynthetisierter DNA in einem Gesamtvolumen von 11 ml beladen und mit 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA; 0,05 M Tris/HCl pH 6,75 eluiert (2.5.). Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/10 min. Anteile der einzelnen Fraktionen wurden ausgezählt. —o—o— = ^{3}H-Ipm.

Diese so gereinigte SDS-Fraktion stellt ca. 1,5% der Gesamt-DNA dar und ist spezifisch sehr hoch markiert (ca. 15 000 Ipm/ µg DNA). Mit ihr wurden erneut Untersuchungen auf Gehalt an Einsträngigkeit durchgeführt. Abb. 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der isopyknischen CsCl- und Cs_2SO_4-Zentrifugationen dieser DNA-Fraktion. Langzeit-^{14}C-markierte DNA diente als Referenzsubstanz.

Abb. 6 und 7: Isopyknische CsCl- (Abb. 6) und Cs_2SO_4- (Abb. 7) Zentrifugation: 5 min. mit ^{3}H-Thymidin markierte DNA wurde nach der Isolierung (2.3.1.) 5 min beschallt und anschließend über eine Nitrocellulose-Säule chromatographiert. Mit Hilfe einer Sephadex G-50 Säule wurde das SDS abgetrennt, die neusynthetisierte DNA mit langzeit-^{14}C-markierter, allgemeiner Zell-DNA als Referenzsubstanz gemischt und im 60 Ti-Rotor analysiert, wie unter (2.7.) beschrieben. —o—o— = ^{3}H-Ipm;
—Δ—Δ— = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ_{25}

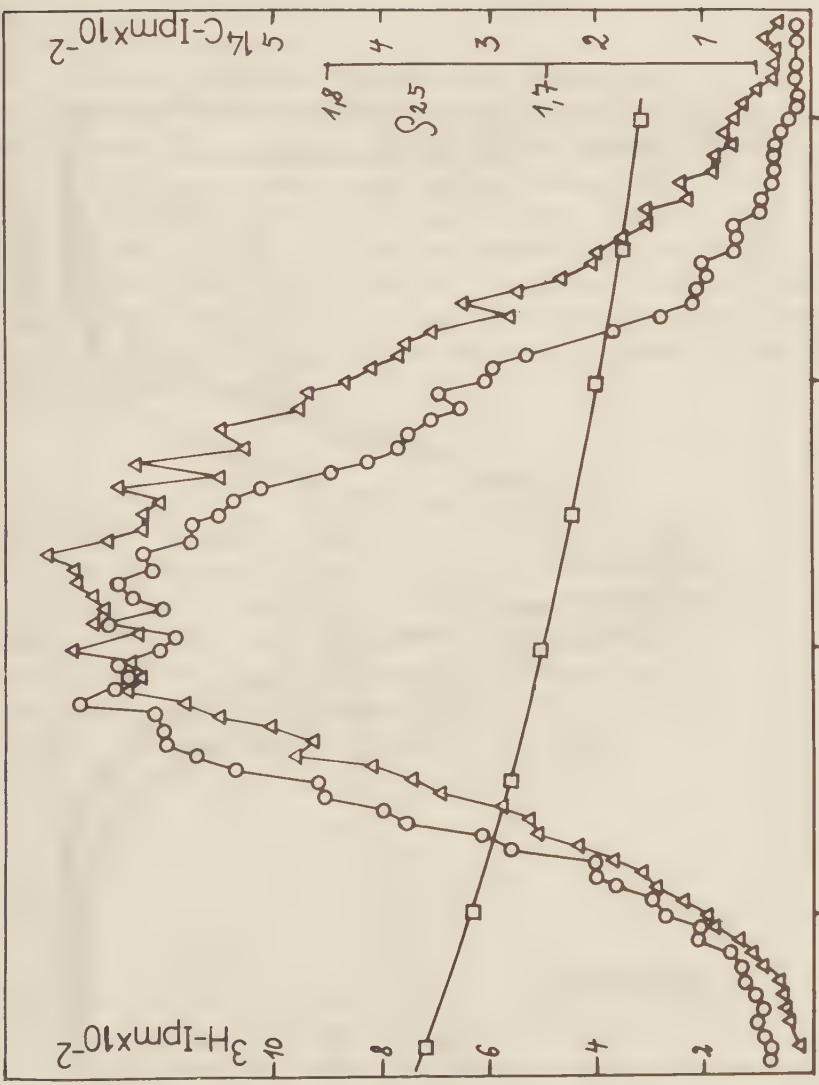

3H-Ipmx10-2
14C-Ipmx10-2
Fraktion
20
40
60
80
2
4
6
8
10
1
2
3
4
5
1,8
2,5
1,7

Abb. 6:

Abb. 7: Legende siene Seite 2o

Es treten jetzt tatsächlich im CsCl-wie im Cs_2SO_4-Gradienten Dichteverschiebungen zwischen Referenz- und nascierender DNA auf. Diese Verschiebung ist nicht sehr stark, aber sicher signifikant.
Um zu zeigen, daß dieses Verhalten der neusynthetisierten DNA nicht durch Beschallungsartefakte sondern durch natürlicherweise vorhandene Eigenschaften hervorgerufen wird, wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt: Das Eluat I der Nitrocellulose-Chromatographie, also die TES-Fraktion der gleichen, beschallten DNA-Präparation, von der die hier untersuchte, nascierende abgetrennt worden war, wurde mit Referenzsubstanz auf die gleiche Weise untersucht. Wie man aus Abb. 8 und 9 ersehen kann tritt hierbei keine Dichteverschiebung auf.

Abb. 8 und 9: Isopyknische CsCl- (Abb. 8) und Cs_2SO_4- (Abb. 9)Zentrifugation: Markierung, Präparation, Beschallung und Nitrocellulose-Chromatographie der DNA wie bei Abb. 6 und 7. Der nicht Nitrocellulose-bindende Anteil (TES-Fraktion) wurde zusammen mit Referenz-DNA analysiert. Zentrifugationsbedingungen siehe (2.7.).
—O—O— = ^{3}H-Ipm; —Δ—Δ— = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ_{25}

Abb. 8: Legende siehe Seite 23

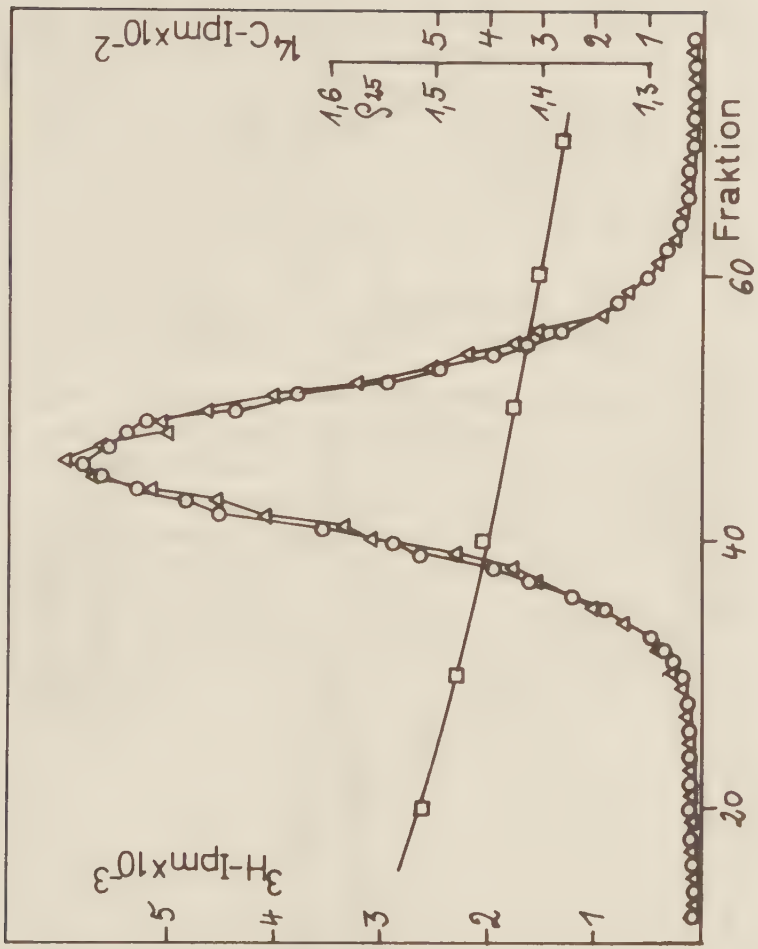


Abb. 9: Legende siehe Seite 23

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der isopyknischen CsCl- und Cs_2SO_4-Zentrifugation erscheint bei der Chromatographie der nascierenden DNA über Hydroxyapatit im Elutionsbereich einsträngiger DNA ein Radicaktivitätsgipfel, der 30,7% des Gesamteluates ausmacht. 69,3% der Radioaktivität wird im Elutionsbereich doppelsträngiger DNA von der Hydroxyapatit-Säule gewaschen. Chromatographiert man dagegen das Eluat I der Nitrocellulose-Chromatographie, die TES-Fraktion, so erhält man lediglich einen Gipfel. Hier sind ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitäten praktisch identisch. Abb. 10 und 11 veranschaulichen das.

Abb. 10 und 11: Hydroxyapatit-Chromatographie: DNA wurde 5 min. mit ^{3}H-Thymidin markiert (2.2.1.), nach der Standard-Methode isoliert (2.3.1.), 5 min. beschallt (2.11.) und über Nitrocellulose chromatographiert (2.4.). Sowohl das Eluat I (TES-Fraktion) - Abb. 11 - wie auch das Eluat II (SDS-Fraktion) - Abb. 10 - wurden mit Referenz-DNA gemischt und zusammen chromatographiert. Chromatographie- und Elutionsbedingungen wie unter (2.6.) beschrieben. -O-O- ^{3}H-Ipm; -Δ-Δ- = ^{14}C-Ipm; -□-□- = M PO_4.

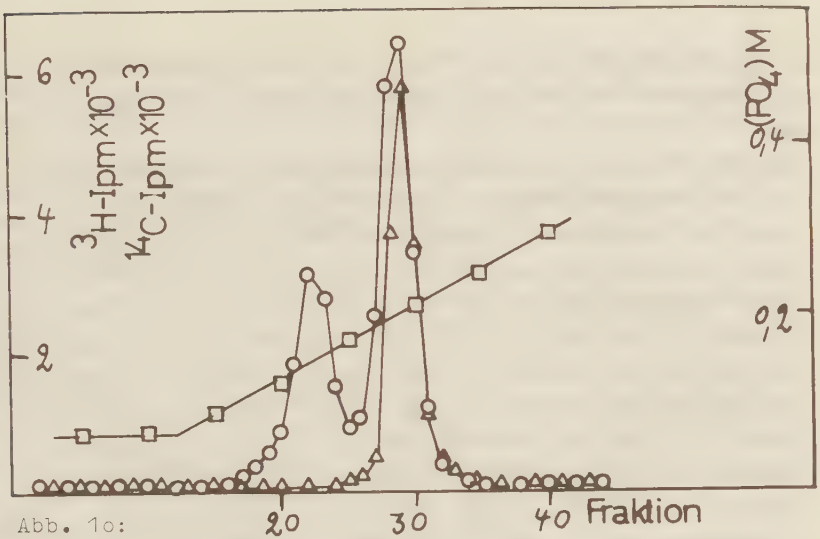

6
4
2
^{3}H-Ipm×10^{-3}
^{14}C-Ipm×10^{-3}
0,4
0,2
(PO$_4$) M
20
30
40
Fraktion

Abb. 1o:

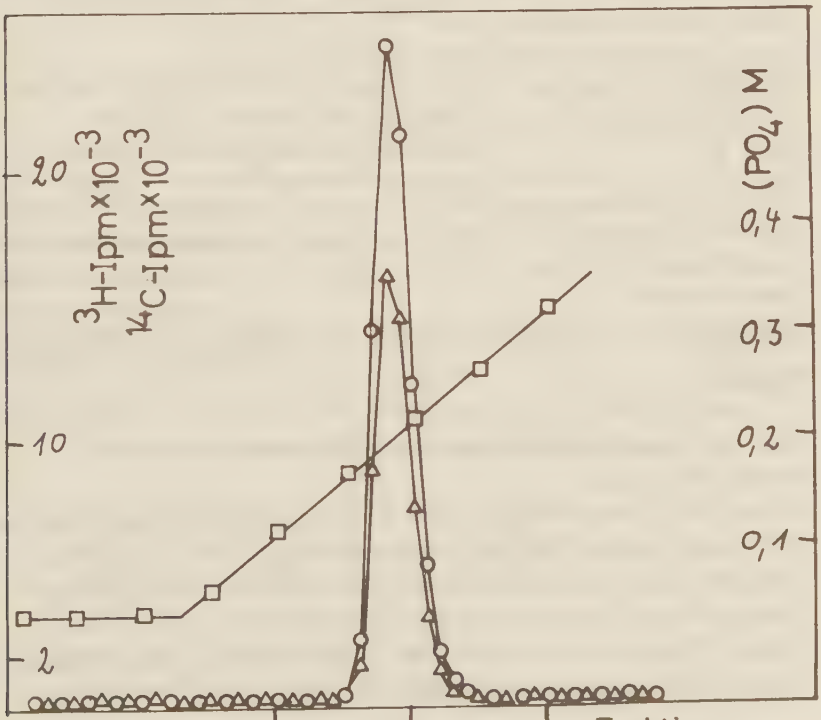

20
10
2
^{3}H-Ipm×10^{-3}
^{14}C-Ipm×10^{-3}
0,4
0,3
0,2
0,1
(PO$_4$) M
20
30
40
Fraktion

Abb. 11:

Rechromatographie der über Hydroxyapatit-Chromatographie aufgetrennten, beschallten SDS-Fraktionen an Nitrocellulose.

Die DNA, die mit einer PO_4-Konzentration zwischen 0,09-0,17 M vom Hydroxyapatit eluiert wird, bindet, wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wieder vollständig an Nitrocellulose. Dagegen erfolgt mit der DNA, die erst bei höherer PO_4-Konzentration eluiert wird, eine erneute Bindung an Nitrocellulose lediglich zu 83%. Als unbehandelte Kontrolle ist in Tabelle 3 die Radioaktivitätsverteilung einer DNA angegeben, die ebenfalls 5 min. mit ^{3}H-Thymidin markiert (2.2.1.), nach der Standard-Methode präpariert (2.3.1.), beschallt (2.11.) und über Nitrocellulose chromatographiert (2.4.) worden war. Die neusynthetisierte DNA - SDS-Fraktion - wurde sofort über eine Nitrocellulose-Säule rechromatographiert.

Bereich des PO_4-Gradienten in Abb. 10	Prozentuale Radioaktivitätsverteilung auf die Eluate I-III der Nitrocellulose-Chromatographie		
	I	II	III
0,09-0,17 M	0	85	14
0,17-0,25 M	17	75	8
unbehandelte Kontrolle	7,4	79,3	13,2

Tab. 3

Abbau der einsträngigen Bereiche mit Endonuclease aus Neurospora crassa.

Unter der Voraussetzung, daß die Einstrangbereiche für die Nitrocellulose-Affinität verantwortlich sind, sollte es möglich sein, diese Affinität durch Abbau der Einstrangbereiche mit Hilfe einer spezifischen Nuclease aufzuheben. Ebenso sollte sich das Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Chromatographie ändern. Deshalb wurde das Eluat

II der Nitrocellulose-Chromatographie, die beschallte SDS-Fraktion, nach (2.12.) einer Behandlung mit Endonuclease aus Neurospora crassa unterworfen. Mit diesem Material wurde eine Rechromatographie an Nitrocellulose, eine isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation und eine Hydroxyapatit-Chromatographie durchgeführt. Tabelle 4 und Abb. 12 und 13 zeigen die Resultate.
77% der ursprünglich an Nitrocellulose gebundenen Radioaktivität verlieren diese Eigenschaften und die Verschiebung im Cs_2SO_4-Gradienten tritt nicht mehr auf. In der Hydroxyapatit-Chromatographie befindet sich im Elutionsbereich einsträngiger DNA kein Gipfel mehr. Bei dem bei niederer PO_4-Konzentration ausgewaschenen Eluat handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte, die durch Enzymeinwirkung entstanden sind.(37)

	Prozentuale Radioaktivitätsverteilung auf die Eluate I-III der Nitrocellulose-Chromatographie		
	I	II	III
Eluat II der Nitrocellulose-Chromatographie nach Endonuclease-Behandlung	77	18	4
Unbehandelte Kontrolle	7,4	79,3	13,2

Tab. 4: Nitrocellulose-Rechromatographie der beschallten SDS-Fraktion nach Endonuclease-Behandlung.

Abb. 12: Isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation: DNA wurde 5 min. mit ^{3}H-Thymidin markiert (2.2.1.), nach der Standard-Methode (2.3.1.) isoliert, 5 min. beschallt (2.11.), über Nitrocellulose chromatographiert (2.4.) und der neusynthetisierte Anteil einer Endonuclease-Behandlung (2.12.) unterworfen. Zentrifugation im Rotor 60-Ti wie unter (2.7.) beschrieben. —o-o— = ^{3}H-Ipm; -Δ—Δ- = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ 25

Abb. 13: Hydroxyapatit-Chromatographie: In Abb. 13b wurde die DNA genauso behandelt wie in Abb. 12. In Abb. 13a wurde die Endonuclease-Behandlung ausgelassen. Chromatographie wie unter (2.6.) beschrieben.

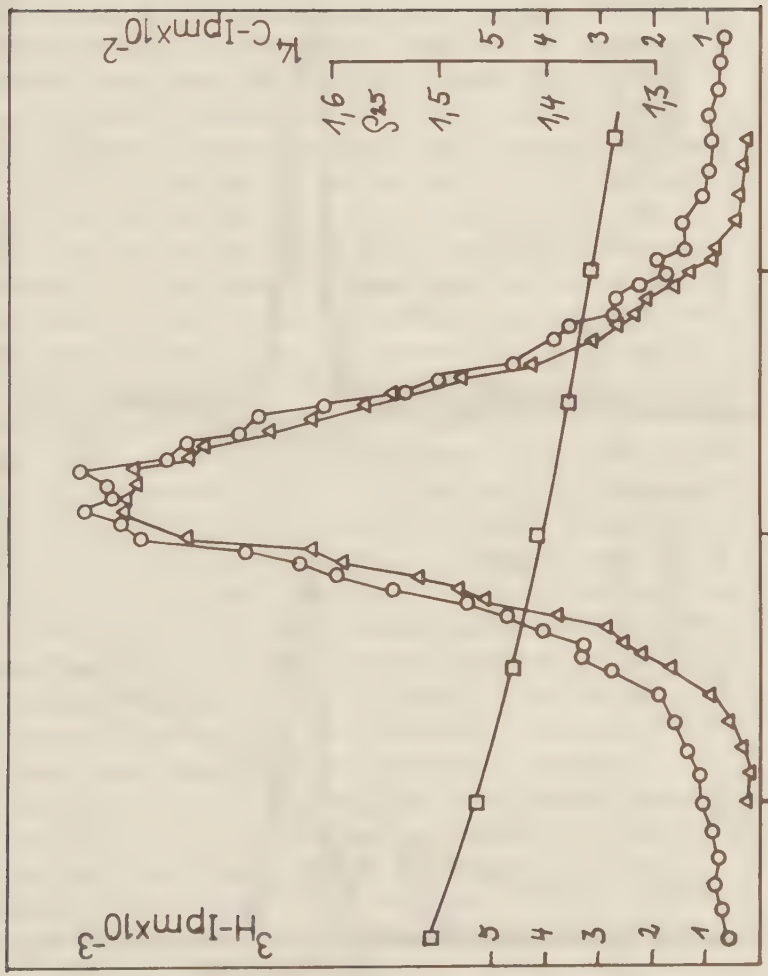


Abb. 12:

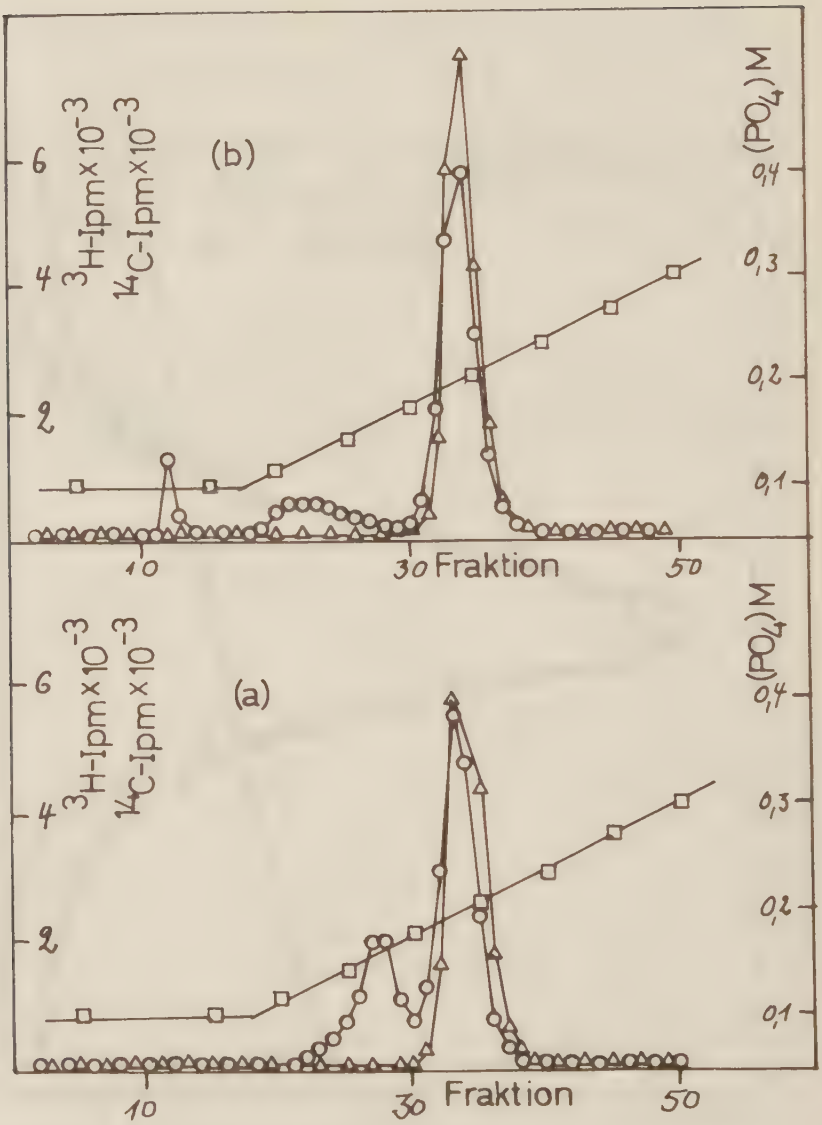


Abb. 13: Legende siehe Seite 30

3.1.2.
Untersuchungen über einen eventuellen RNA-Gehalt der neusynthetisierten DNA (SDS-Fraktion).

Mehrere Faktoren, wie zum Beispiel die geringe "Template"-Spezifität der DNA-Polymerasen im Gegensatz zu den RNA-Polymerasen oder ihre Unfähigkeit wiederum im Gegensatz zu den Polymerasen, überhaupt neue Ketten zu initiieren (18, 19, 2o, 22), führten Kornberg (1o), Lark (9) und Okazaki (11, 12) zu dem Schluß, daß RNA bei der Replikation als "Primer" dient. Sato et al. (25) berichteten von kovalent gebundener RNA in mit Hilfe der Nitrocellulose-Chromatographie isolierter, nascierender DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen. Dabei wandten die Autoren, abgesehen von der DNA-Isolierung, die von Probst et al. (5) entwickelte Methode zur Gewinnung der neureplizierten DNA an. Das sollte überprüft werden und im Hinblick auf die Ursache für die erhöhte Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA untersucht werden. Die im hiesigen Institut entwickelte Methode zur Gewinnung nascierender DNA in größerem Maßstab eignet sich gut zur Abklärung dieser Fragestellung.
Wenn RNA kovalent an DNA gebunden ist, steigt die Schwebedichte der DNA im Cs_2SO_4-Gradienten. Einsträngige DNA-RNA-Moleküle kann man also im Dichtegradienten von reinen DNA-Molekülen unterscheiden. Da es keinen Einfluß auf die Dichte haben dürfte, ob der DNA- oder RNA-Anteil radioaktiv markiert ist, wurde zuerst nur der DNA-Anteil markiert.
Um zu testen, ob nascierende DNA mit einem kurzen RNA-Stück verbunden ist, wurde die DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen nach mehr oder weniger kurzen ^{3}H-Thymidin-"Pulsen" extrahiert, unterschiedlich denaturiert und durch isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation analysiert.

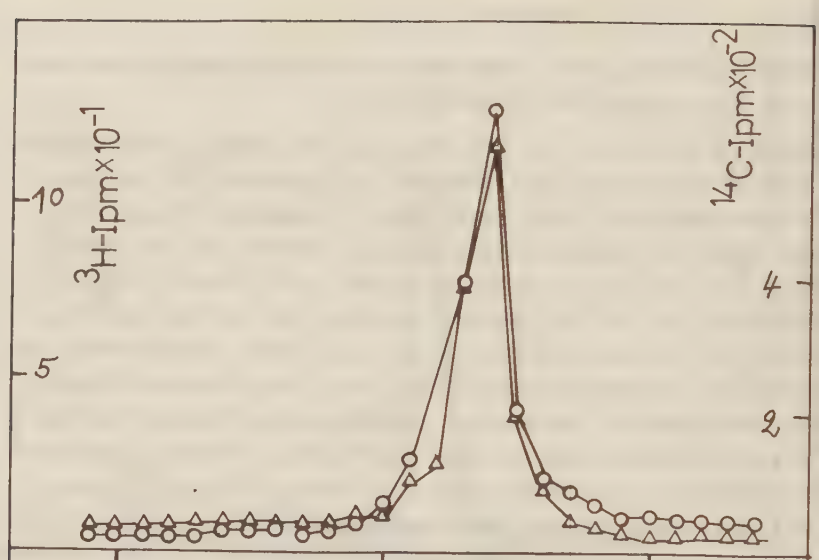

^{3}H-Ipm x 10^{-1}
10
5
^{14}C-Ipm x 10^{-2}
4
2
Fraktion

Abb. 15:

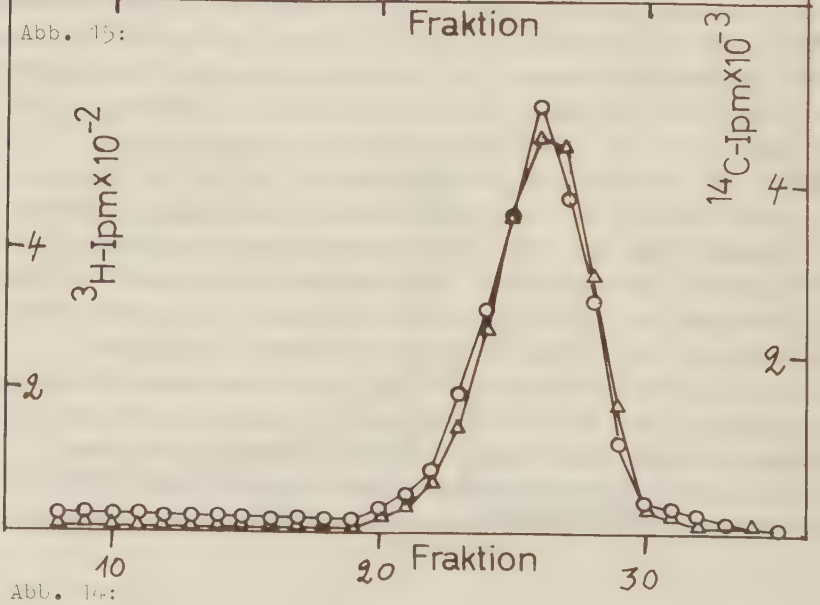

^{3}H-Ipm x 10^{-2}
4
2
^{14}C-Ipm x 10^{-3}
4
2
10
20
30
Fraktion

Abb. 16:

Abb. 14 und 15: Isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation: 1 min. mit ^{3}H-Thymidin markierte (2.2.1.) DNA wurde nach der Standard-Methode (3.2.1.) präpariert. Ihr über Nitrocellulose-Chromatographie (2.4.) abgetrennter, neusynthetisierter Anteil wurde nach SDS-Entfernung denaturiert. In Abb. 14 wurde durch 10-minütiges Erhitzen bei 100° C und anschließendes, rasches Abkühlen, in Abb. 15 durch 30-minütiges Inkubieren in 90% Formamid bei 37° C denaturiert. Als Referenz-DNA diente denaturierte, langzeit-^{14}C-markierte DNA. Zentrifugationsbedingungen im SW 50 L wie bei (11) beschrieben. 100 µl-Fraktionen wurden gesammelt.
—o—o— = ^{3}H-Ipm; —Δ—Δ— = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ_{25}

Es ergaben sich keine signifikanten Dichteverschiebungen. Da aber die Wahrscheinlichkeit, "Primer"-RNA zu entdecken, mit der Kürze des "Pulses" zunimmt (11), wurde in einem weiteren Versuch ein 30 sec.-"Puls" gegeben. Um Effekte, die durch die DNA-Präparation auftreten können, auszuschließen, wurde die DNA nach Sato et al. (2.3.2.) wie nach der Standard-Methode (2.3.1.) isoliert. 20 min. vor dem "Puls" wurden den Versuchstieren 20 µl/g Körpergewicht einer 5×10^{-4} M Amethopterinlösung injiziert, um die endogenen Thymidin-"Pools" verarmen zu lassen. Aber auch hierbei ergab sich keine Dichteverschiebung.

Abb. 16 und 17: Isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation: Zwei Ascites-Mäusen wurden 20 µl/g Körpergewicht einer 5×10^{-4} M Amethopterinlösung injiziert. Nach 20 min wurden die Ascites-Tumor-Zellen entnommen, die DNA 30 sec. mit 600 µCi ^{3}H-Thymidin markiert (2.2.1.), nach Sato et al. (2.3.2.) - Abb. 16 - bzw. nach Paoletti et al. (2.3.1.) - Abb. 17 - isoliert, und deren neureplizierter Anteil über Nitrocellulose-Chromatographie abgetrennt (2.4.). Nach SDS-Entfernung wurden die Proben hitzedenaturiert, mit hitzedenaturierter, langzeit-^{14}C-markierter DNA als Referenz ver-

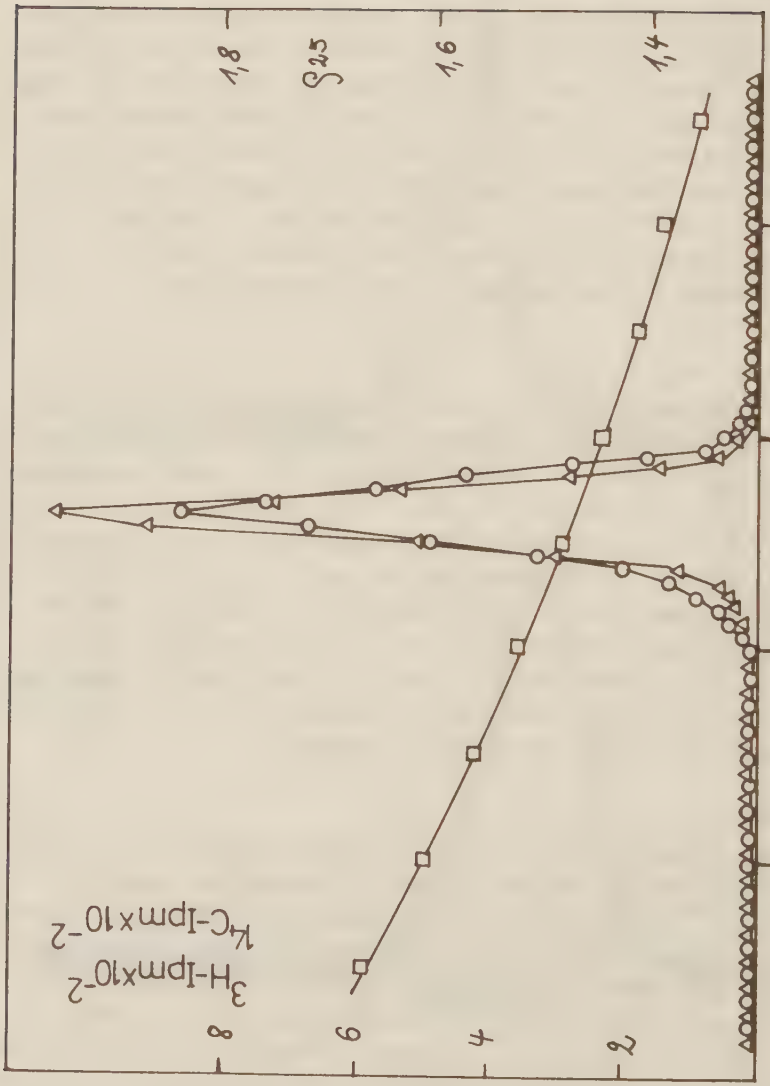


Abb. 16: Legende siehe Seite 35

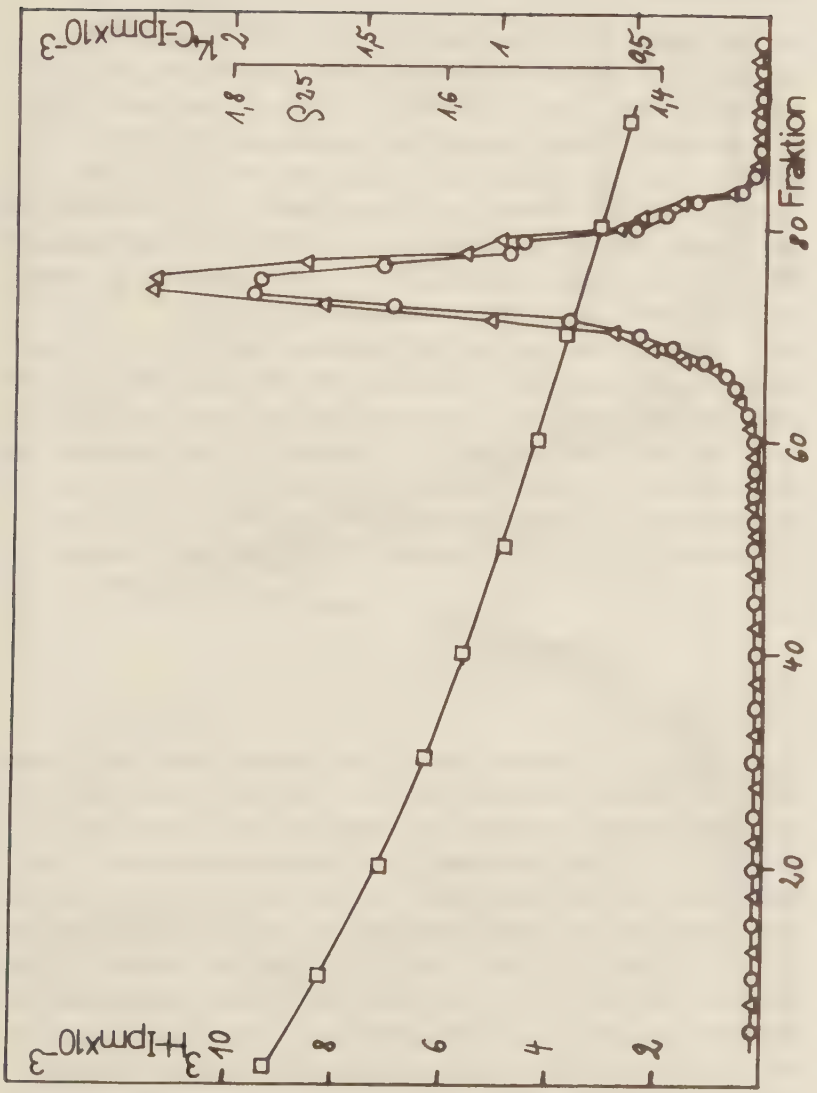


Abb. 17: Legende siehe Seite 35

setzt und wie im Methodenteil beschrieben im Rotor 60-Ti zentrifugiert und analysiert. —O—O— = ^{3}H-Ipm; —Δ—Δ— = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ_{25}

Im Zusammenhang mit den unter (3.1.1.2.) beschriebenen Experimenten wurden noch zwei weitere isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugationen mit beschallter, neusynthetisierter DNA durchgeführt. Einmal wurde die nascierende DNA hitzedenaturiert, ein anderes Mal alkalibehandelt und dann hitzedenaturiert. Langzeit-^{14}C-markierte, hitzedenaturierte DNA diente jeweils als Referenz. Im Falle der Anwesenheit kovalent gebundener RNA wäre eine erhöhte Dichte zu erwarten, die nach Alkali-Behandlung verschwindet.
Abb. 18 und 19 zeigen, daß in Richtung auf höhere Dichten keine Verschiebung im Verhältnis zur Referenz-DNA auftritt. Auch ergeben sich keine Unterschiede zwischen beiden Fällen. Die Schultern im Bereich niederer Dichten könnten doppelsträngige DNA-Abschnitte darstellen, die durch Renaturieren bei zu langsamem Abkühlen oder während des isopyknischen Laufes im neutralen Milieu zustande kommen.

Abb. 18 und 19: Isopyknische Cs_2SO_4-Zentrifugation: 5 min. mit ^{3}H-Thymidin markierte (2.2.1.) DNA wurde nach der Standard-Methode (2.3.1.) isoliert, 5 min. nach (2.11.) beschallt und über Nitrocellulose chromatographiert (2.4.) Nach Entfernung des Detergens wurde die neusynthetisierte DNA zum einen nach Alkali-Behandlung (0,3 M NaOH, 15 h bei 37° C) hitzedenaturiert - Abb. 18 - und zum anderen sofort hitzedenaturiert - Abb. 19. Nach Zugabe von denaturierter Referenz-DNA wurde im 60-Ti Rotor wie unter (2.7.) beschrieben zentrifugiert und analysiert. - O—O— = ^{3}H-Ipm; —Δ—Δ— = ^{14}C-Ipm; —□—□— = ρ_{25}

^{3}H-Ipmx10^{-2}
^{14}C-Ipmx10^{-2}
S$_{2,5}$
1,6
1,5
1,4
1,3
10
8
6
4
2
20
40
60
Fraktion

Abb. 18:

Abb. 19: Legende siehe Seite 38

Im hiesigen Institut wurden weitere Untersuchungen über eine Beteiligung von RNA an nascierender, über Nitrocellulose-Chromatographie gewonnener DNA durchgeführt (21). Auf dort genannte Effekte, die eine solche Beteiligung simulieren können, wird in der Diskussion eingegangen.

3.2.

Lage des die Nitrocellulose-Affinität verursachenden Bereiches relativ zum Replikationspunkt

3.2.1.

Einbau radioaktiven Präkursors in die DNA in Abhängigkeit von der Zeit bei sogenannten "Puls"- und "Puls-Chase"-Experimenten

Die folgenden Versuche wurden mit DNA aus Zellen durchgeführt, die einerseits 1 min. mit ^{3}H-Thymidin markiert waren ("Puls"-Zellen), andererseits im Anschluß an den 1-minütigen "Puls" 100fach mit warmem Kulturmedium, das 10^{-5} M kaltes Thymidin enthielt, verdünnt und dann bis zu 60 min. weiterinkubiert waren ("Puls-Chase"-Zellen). Unter den in (2.2.1.) beschriebenen Bedingungen steigt die Markierungsrate der DNA der "Puls"-Zellen am Ende des "Pulses" noch, da die intrazellulären "Pools" noch nicht mit radioaktivem Thymidin gesättigt sind. Abb. 20 veranschaulicht das. Im Falle der "Puls-Chase"-Zellen findet auch nach Ende des "Pulses" Wachstum und Zellteilung ohne Medium-Wechsel bis zu 10 Stunden statt. Der radioaktive Präkursor war jedoch lediglich verdünnt worden, so daß weiterhin ^{3}H-Thymidin in die DNA eingebaut wurde. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, beträgt allerdings die Markierung, die zwischen 20 und 60 min. inkorporiert wurde, weniger als 1,3% der während der ersten 20 min. eingebauten Radioaktivität; daher kann man in der Praxis das "Puls"-Ende bei spätestens 20 min. annehmen. Aus Abb. 21 kann man den Verlauf der Markierungsdichte der neusynthetisierten DNA zu jedem Zeitpunkt während des "Puls-Chase"-Experimentes ableiten. Dies führt zu Abb. 22.

Abb. 20 und 21: Markierungs-Kinetik während der "Puls"- - Abb. 20 - und der "Chase"-Periode -Abb. 21. Die "Puls"- und "Chase"-Bedingungen sind unter (2.2.1.) und (2.2.2.) beschrieben. Um möglichst exakt vorgehen zu können, wurden

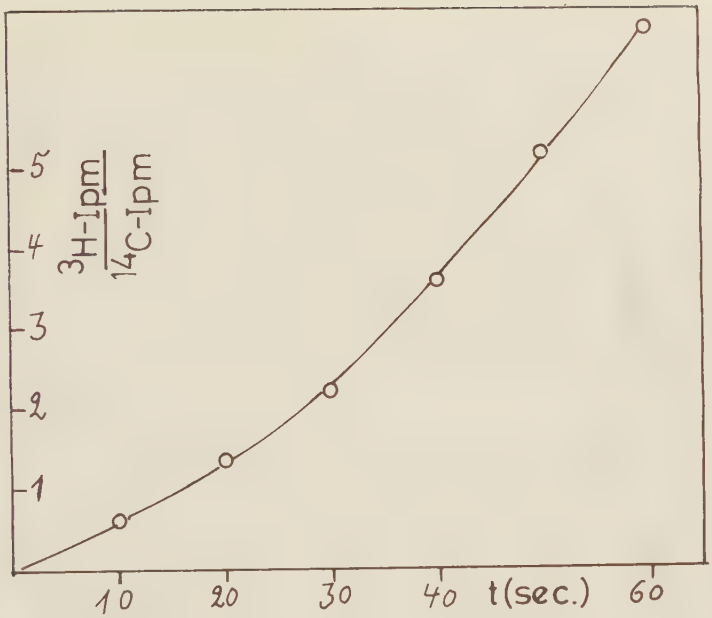

5
4
3
2
1
3H-Ipm / 14C-Ipm
10
20
30
40
t(sec.)
60

Abb. 20:

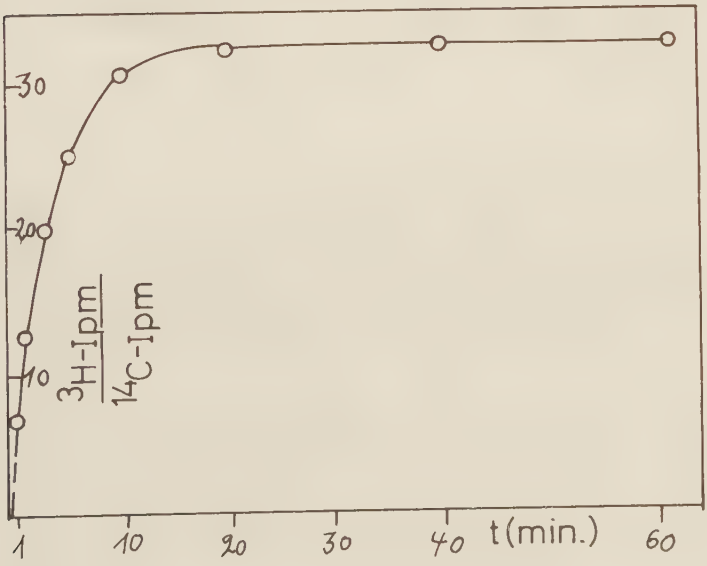

30
20
10
3H-Ipm / 14C-Ipm
1
10
20
30
40
t(min.)
60

Abb. 21:

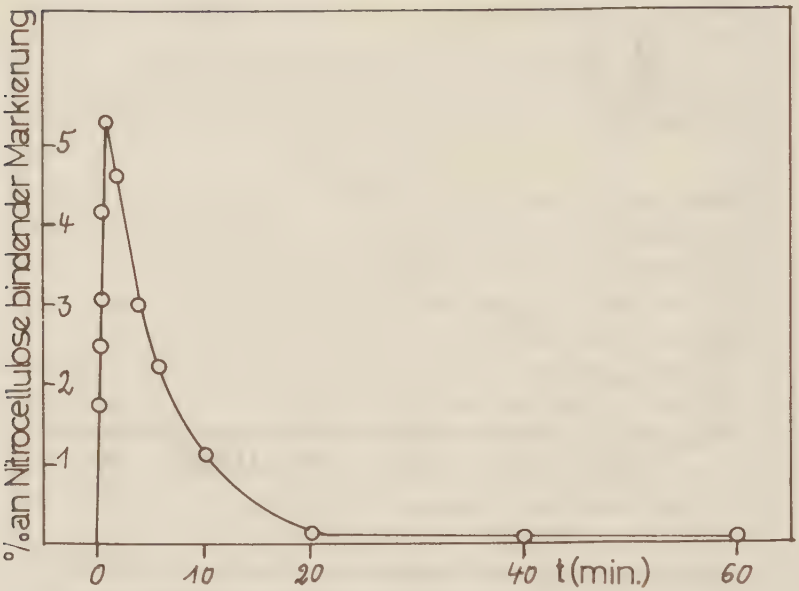


Abb. 21:

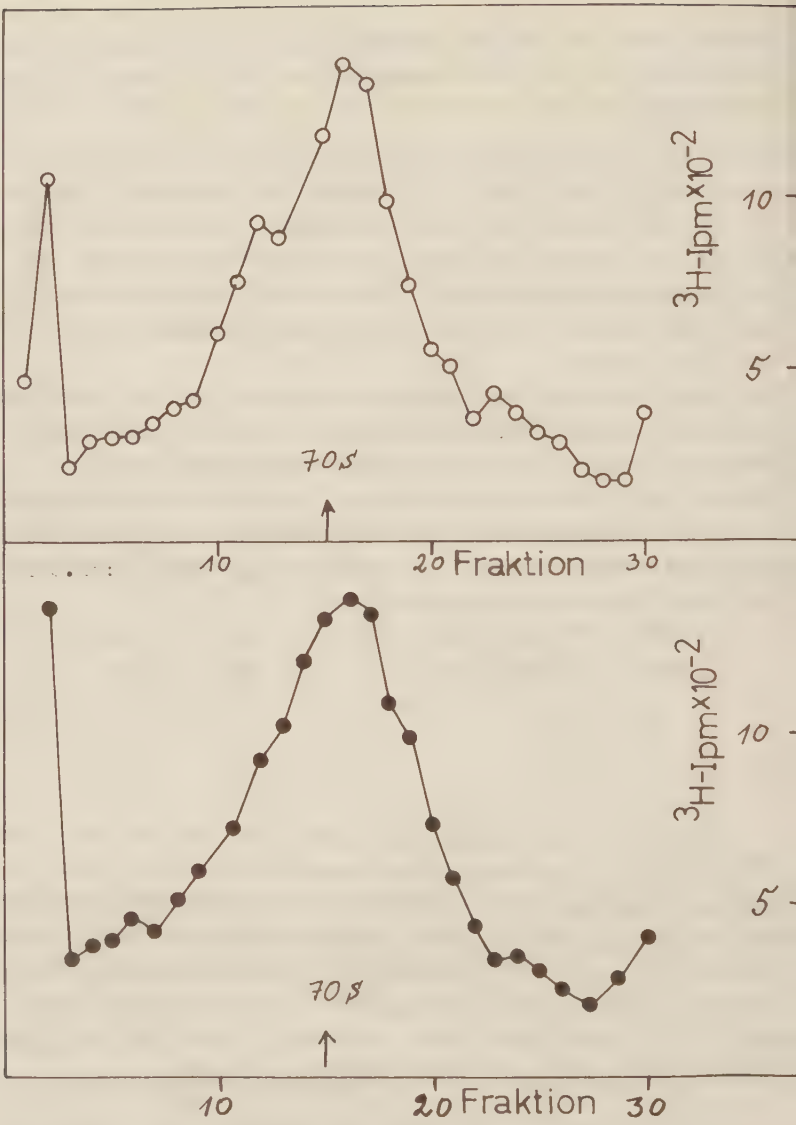
Ascites- Tumor-Zellen einer Maus verwandt, die 24 Stunden vor dem "Puls"-bzw. "Puls-Chase"-Experiment mit 2 µCi ^{14}C-Thymidin vorinjiziert wurde. Daher ist der Einbau des ^{3}H-Thymidin in säureunlösliches Material durch das Anwachsen des $^{3}H/^{14}C$-Verhältnis angegeben (—o-o—).

Abb. 22: Markierungsrate während des "Puls-Chase"-Experimentes in Abb. 21. Die Werte sind aus den Steigungen der Kurve in Abb. 20 abgeleitet und repräsentieren die Markierungsdichte der zu jedem Zeitpunkt der Einbauperiode neusynthetisierten DNA.

3.2.2.
Abhängigkeit des an die Nitrocellulose bindenden Anteils der Markierung von der Teilchengröße der "Puls"- bzw. "Puls-Chase"-DNA

Unter der Voraussetzung, daß die Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA auf speziellen Strukturen beruht, die in der Gegend des Wachstumspunktes lokalisiert sind, sollte man durch Einführung von Doppelstrangbrüchen die radioaktive Markierung bei "Puls-Chase"-DNA erheblich leichter von den bindenden Strukturen trennen können als bei "Puls"-DNA.
Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die DNA auf eine möglichst schonende Weise präpariert (2.3.4.): Einer Kern-Präparation folgte Lyse mit SDS, Enzymbehandlung mit RNAase und Pronase sowie eine präparative CsCl-Zentrifugation. Die so gereinigte DNA unterlag bis zu diesem Punkt geringer Scherbelastung und besitzt s_{20w}-Werte um 70, wie aus Abb. 23 und 24 hervorgeht.

Abb. 23 und 24: Neutrale Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation: Die DNA wurde nach (2.3.4.) isoliert. 5-20% Rohrzucker; 5° C; 8 h; 22 000 Upm; Rotor SW 25,1. Die Gradienten wurden vom Boden her fraktioniert. Fraktionsgröße 1 ml. Abb. 23: 1 min. "Puls"-DNA; Abb. 24: 1 min-"Puls"-60 min-"Chase"-DNA. —o-o— = ^{3}H-Ipm; -●-●- = ^{3}H-Ipm.


70S
10
20 Fraktion
30
^{3}H-Ipm×10^{-2}
10
5
70S
10
20 Fraktion
30
^{3}H-Ipm×10^{-2}
10
5

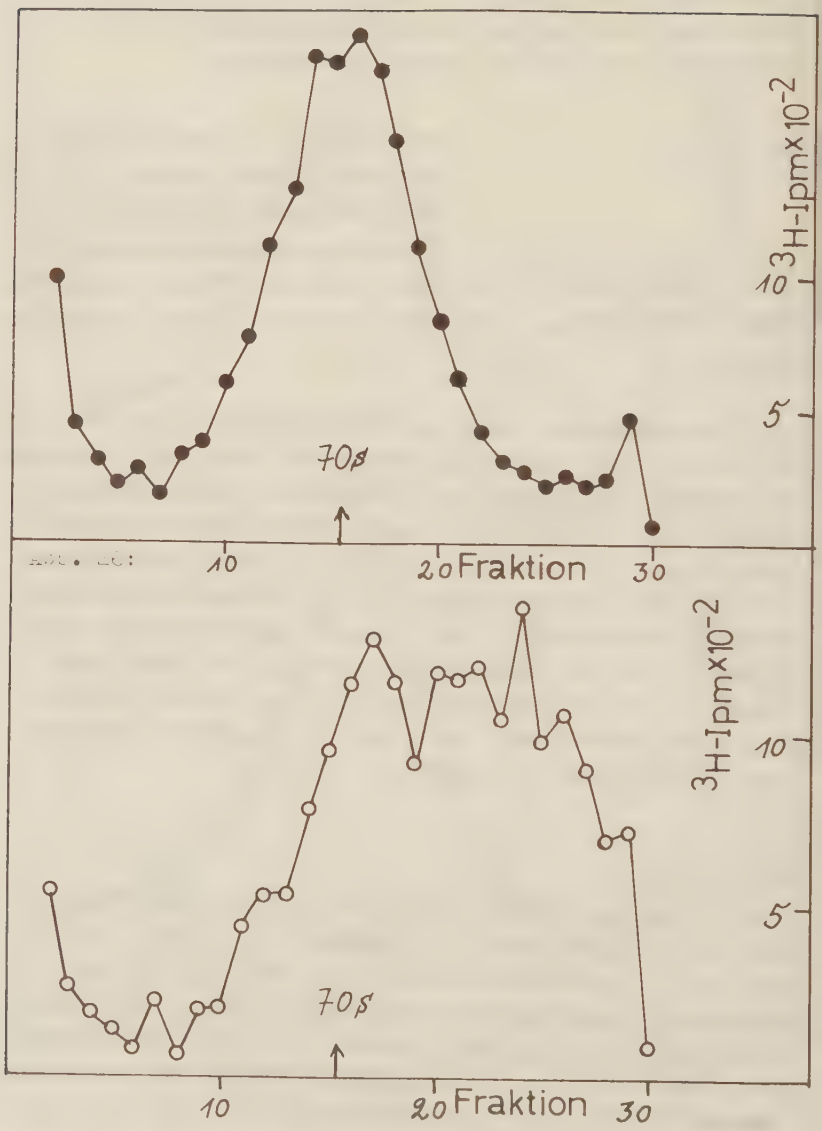
Beide DNA-Proben wurden der Nitrocellulose-Chromatographie unterworfen. Wie Tabelle 6 verdeutlicht, sind bei dieser DNA-Präparation von der "Puls"-DNA noch 90%, von der "Puls-Chase"-DNA noch 69% Nitrocellulose-bindend.

	Prozentuale Radioaktivitätsverteilung auf die Eluate I-III der Nitrocellulose-Chromatographie		
	I	II	III
"Puls"-DNA	10	46	44
"Puls-Chase"-DNA	31	36	33

Tab. 6

Die Scherbelastung durch die Chromatographie ist, wie man aus Abb. 25 und 26 ersehen kann, nicht sehr groß. Daß die "Puls"-DNA im Gegensatz zur "Puls-Chase"-DNA teilweise im Laufe der Chromatographie fragmentiert wurde, ist kein Hinweis auf eine erhöhte Anfälligkeit neusynthetisierter DNA gegenüber Scherkräften. Auch in anderen Versuchen mit "Puls"-, "Puls-Chase"- und langzeit-markierter DNA trat mitunter eine teilweise Fragmentierung auf. Sehr wahrscheinlich liegt der Grund dafür in den Durchflußbedingungen der DNA-Lösungen durch das festgepackte, faserige Bett der Nitrocellulose-Säule.

Abb. 25 und 26: Neutrale Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation: DNA wurde nach der CsCl-Methode (2.3.4.) isoliert, und deren neusynthetisierter Anteil über eine Nitrocellulose-Chromatographie abgetrennt (2.4.). Zentrifugationsbedingungen: 5-20%Rohrzucker; 5° C; 8 h; 22 000 Upm; Rotor SW 25,1 siehe (2.8.).—o—o— = ^{3}H-Ipm der "Puls"-DNA; —●—●— = ^{3}H-Ipm der "Puls-Chase"-DNA.


70S
10
20 Fraktion
30
^{3}H-Ipm x 10^{-2}
10
5
70S
10
20 Fraktion
30
^{3}H-Ipm x 10^{-2}
10
5

Beide SDS-Fraktionen (Eluate II der Nitrocellulose-Chromatographie) wurden zur Entfernung des Detergens gegen o,4 TES dialysiert und dann jeweils gedrittelt. Der erste Teil blieb unbehandelt, der zweite wurde 55 Kryolyse-Zyklen unterworfen (2.1o.), während der dritte beschallt wurde (2.11.). Die Abnahme der s_{20w}-Werte durch Kryolyse und Beschallung geht aus Abb. 27, 28, 29 und 3o hervor.

Abb. 27:

Abb. 27, 28, 29 und 3o: Neutrale Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation: DNA wurde nach der CsCl-Methode (2.3.4.) isoliert und deren replizierender Anteil über Nitrocellulose-Chromatographie abgetrennt (2.4.). Nach Entfernung des Detergens wurde ein Teil -Abb. 27 und 28- kryolysiert (2.1o.), ein zweiter Teil -Abb. 29 und 3o- beschallt (2.11.). Zentrifugationszeit: 16 h. Sonstige Bedingungen wie bei Abb. 23 und 24 beschrieben.

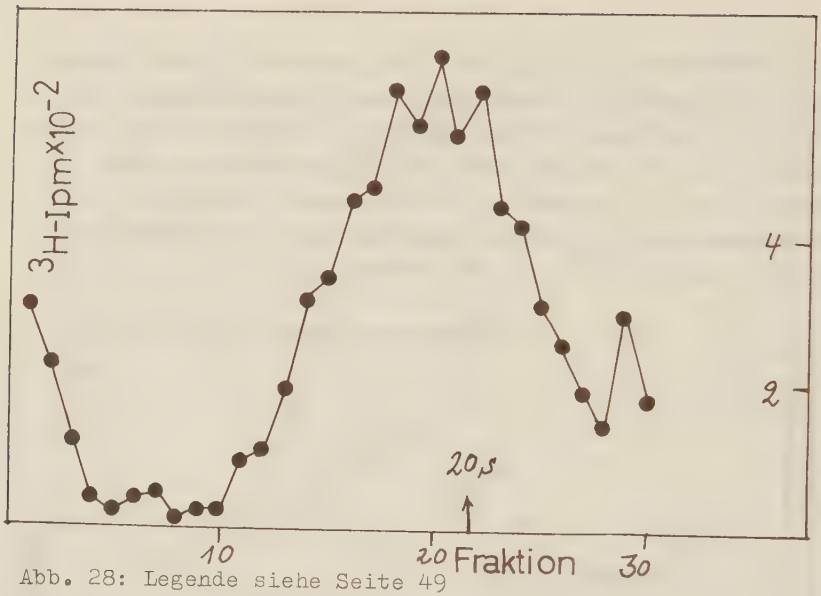


Abb. 28: Legende siehe Seite 49

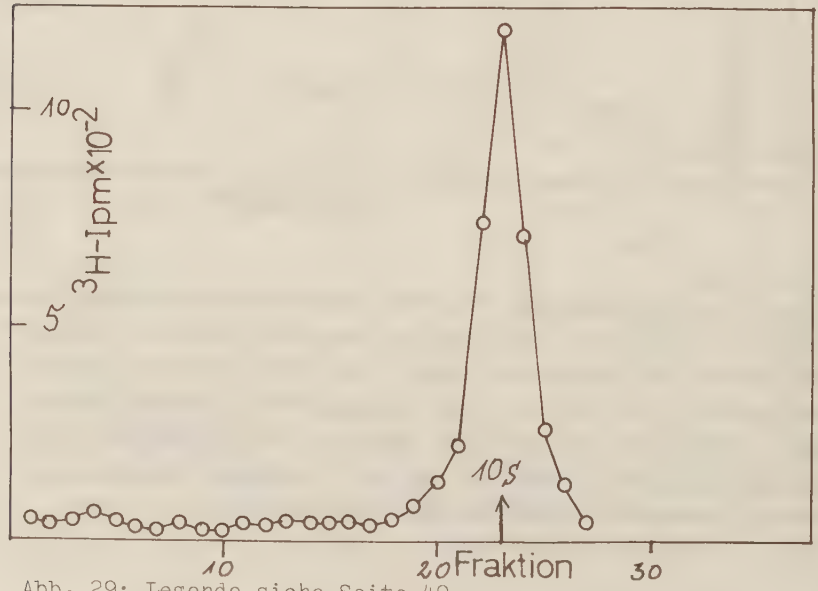


Abb. 29: Legende siehe Seite 49

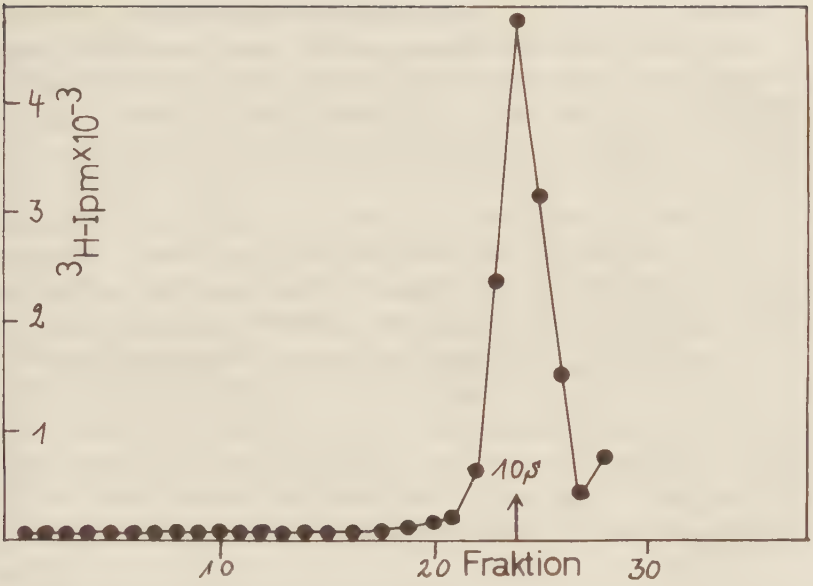


Abb. 3o: Legende siehe Seite 49

Die erhaltenen 6 unterschiedlichen DNA-Proben wurden einer zweiten Nitrocellulose-Chromatographie unterzogen. Diese wurde mit allen Proben gleichzeitig an 6 identischen Säulen durchgeführt. 88% der unbehandelten "Puls"-DNA bzw. 94% der entsprechenden "Puls-Chase"-DNA wurden erneut an Nitrocellulose adsorbiert. Die Verkleinerung der Moleküle durch Kryolyse führt bei der "Puls"-DNA lediglich zu einer sehr geringen Abnahme des Anteils der Markierung, der erneut bindet, während bei der "Puls-Chase"-DNA dieser Anteil schon auf weniger als 1/3 seines unkryolysierten Wertes sinkt. Durch die Beschallung wird sogar der erneut bindende Anteil der "Puls"-DNA beträchtlich herabgesetzt, und der der "Puls-Chase"-DNA noch weiter verringert. Tabelle 7 faßt die Ergebnisse der Nitrocellulose-Chromatographie zusammen.

	% erneuter Bindung an Nitrocellulose		
	unbehandelt	kryolysiert	beschallt
"Puls"-DNA	88	85	31
"Puls-Chase"-DNA	94	27	7

Tab. 7:

Diese für "Puls"- bzw. "Puls-Chase"-DNA erhaltenen, unterschiedlichen Resultate erhärten die oben angedeutete Hypothese, daß die an Nitrocellulose bindenden Strukturen in unmittelbarer Nähe des Wachstumspunktes liegen und vielleicht mit ihm identisch sind: Eine zu einem bestimmten Zeitpunkt in die DNA eingebaute Markierung trennt sich im Laufe der weiteren DNA-Replikation immer mehr von den an Nitrocellulose bindenden Strukturen, und kann von diesen immer leichter durch Einführung von Doppelstrangbrüchen getrennt werden.

3.2.3.
Abhängigkeit des an Nitrocellulose bindenden Anteils der "Puls"-Markierung von der Länge der "Chase"-Zeit

Gemäß den oben gezogenen Schlußfolgerungen dürfte nach genügend langer "Chase"-Zeit die "Puls"-Markierung überhaupt nicht mehr an Nitrocellulose binden. Daher wurde ein erneutes "Puls-Chase"-Experiment durchgeführt, wobei die "Chase"-Zeit 2o, 6o und 18o min. betrug. Die DNA wurde nach der pH 9-Methode (2.3.1.) aufgearbeitet. Hierbei wurde nicht besonders auf Vermeidung von Scherkräften geachtet, so daß die gereinigte DNA s_{2ow}-Werte um 2o besitzt. Abb. 31 zeigt den an Nitrocellulose bindenden Anteil der "Puls"-Markierung in Abhängigkeit von der "Chase"-Zeit.
Wie erwartet, sinkt mit zunehmender "Chase"-Zeit der relative Anteil der an Nitrocellulose bindenden "Puls"-Markierung. Die Kinetik dieses Prozesses scheint jedoch nicht die eines einfachen Umwandlungsprozesses (A→B) zu sein. Die Kurve hat einen gewissen biphasischen Charakter. Nach den hier erhaltenen Befunden kann die während eines "Pulses"

markierte, nascierende DNA möglicherweise ihre Nitrocellulose-Affinität auf zwei verschiedene Arten verlieren: Zum größeren Teil schon sehr schnell nach der Markierung (daher auch die anfänglich sehr schnelle Abnahme der an Nitrocellulose bindenden Radioaktivität), ein kleinerer Teil jedoch in einem sich lang hinziehenden Prozeß, der zu der geringen Abnahme-Rate der Bindung bei langen "Chase"-Zeiten führt. Die sogenannte "Background-Bindung" der allgemeinen DNA auf den Säulen, die lediglich o,5% ausmacht, kann zur Erklärung dieses Phänomens nicht herangezogen werden. Auf eine Interpretation wird in der Diskussion eingegangen.

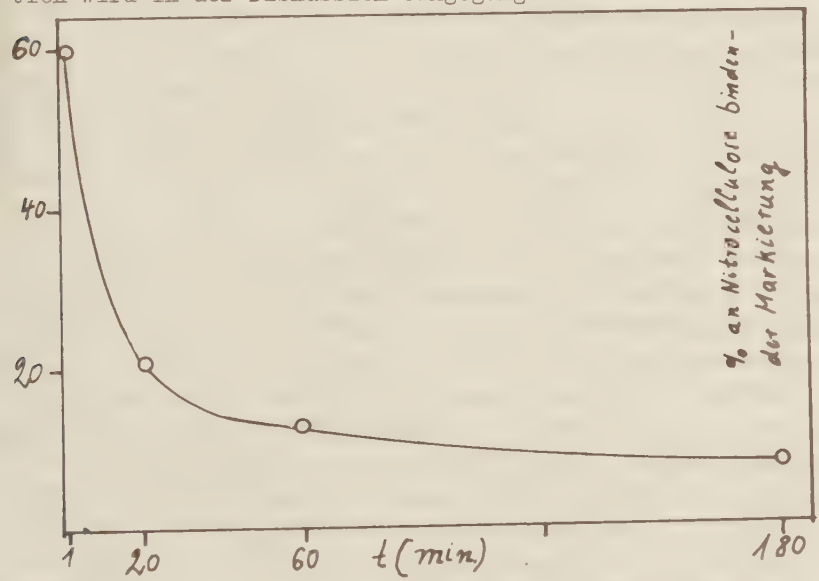


Abb. 31: Kinetik der Nitrocellulose-Affinität von DNA-Markierung in einem "Puls-Chase"-Experiment. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurden Zellproben entnommen und durch Abkühlen auf 0° C gestoppt. Die DNA wurde nach der pH 9-Methode (2.3.1.) isoliert und gleichzeitig über 2 ml-Nitrocellulose-Säulen chromatographiert. "Puls-Chase"-Bedingungen wie unter (2.2.2.) beschrieben.

4.
Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Grund für die erhöhte Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA zu finden. Als Erklärungsmöglichkeit kommen zunächst einsträngige Zwischenprodukte (34)durchaus in Frage, da die Adsorption von DNA an Nitrocellulose durch Denaturierung drastisch erhöht wird (4,32).
Wie in der Einleitung erwähnt, nahmen im Laufe der Zeit mehrere Autoren in der Literatur zu der Frage Stellung,ob die neusynthetisierte DNA ein- oder doppelsträngig ist. Jedoch widersprachen sie sich vielfach. Zur Lösung dieser Widersprüche boten sich die Befunde von Habener et al. (15) an. Diese Autoren zeigten, daß je nach DNA-Extraktionsbedingungen die neusynthetisierte DNA von HeLa-Zellen in ein- wie in doppelsträngiger Form isoliert werden konnte. Sehr wahrscheinlich liegt die neureplizierte DNA in der Zelle in einem destabilisierten Zustand vor, wodurch sie besonders anfällig für Denaturierung während der Isolierung ist. Die destabilisierenden Faktoren gehören vielleicht zu der Gruppe der "unwinding Proteins", die am Replikationsprozeß beteiligt sein sollen (33). Möglicherweise sind sie mit dem replizierenden Chromatin im S-Phasen Kern assoziiert und können nach Zerstörung der Kernstruktur leicht vom Nukleoprotein getrennt werden. Bei der DNA-Isolierung kommt es daher auf den Zeitpunkt der Zerstörung der Kerstruktur und der Dissoziation der Nukleoproteine an. Vermeidet man die Gleichzeitigkeit dieser beiden Schritte, wie es bei der Standard-pH 9-Methode geschieht, kann man, wie gezeigt wurde, die Umwandlung in einsträngige Form verhindern.
Die Tatsache, daß Sato et al. (8) Lyse der Zellen und Kerne und Dissoziation der Nukleoproteine gleichzeitig vornehmen, und zwar bei erhöhter Temperatur und sehr niedriger Jonenstärke, kann dazu führen, daß einsträngige Bereiche erzeugt werden. Daß Sato allerdings überhaupt keine doppelsträngige,frisch replizierte DNA erhält, erscheint unerklärlich.

Andererseits konnte nach den genannten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden, daß die einsträngigen Bereiche in der neusynthetisierten DNA aus Ascites-Tumor-Zellen einen so geringen Prozentsatz des Gesamt-Moleküls ausmachten, daß sie mit den anfänglichen Methoden nicht erfaßt werden konnten. Auch andere Autoren fanden im Gegensatz zu Sato lediglich geringen einsträngigen Charakter. Wir fanden zunächst gar keine einsträngige Bereiche (26). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die bindende Fraktion anzureichern. Durch extreme Beschallung wurde die Gesamt-DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen fragmentiert, bevor der neusynthetisierte Anteil über Nitrocellulose-Chromatographie abgetrennt wurde. Auf diese Weise könnten eventuell vorhandene, sehr kleine einsträngige Bereiche, wie sie vor Kurzem auch von Joannou (34) vorgeschlagen wurden, relativ zu den überwiegend doppelsträngigen Bereichen angereichert werden. Zudem wurde durch Erhöhung der Anzahl der Fraktionen und Verflachung der Gradienten die Empfindlichkeit der isopyknischen Zentrifugation erhöht. Tatsächlich zeigten sich dann in dieser Anordnung im CsCl- und im Cs_2SO_4-Gradienten signifikante Dichteverschiebungen der neusynthetisierten DNA gegenüber der allgemeinen Zell-DNA. In Übereinstimmung damit stand auch das Elutionsprofil der Hydroxyapatit-Chromatographie, das sowohl im Bereich einsträngiger wie in dem doppelsträngiger DNA je einen Gipfel zeigt. Ein erneuter Nitrocellulose-Bindungstest mit von Hydroxyapatit als einwie doppelsträngig eluierbarer, neureplizierter, beschallter DNA ergab 100%ige Bindung der Radioaktivität des einsträngigen und eine 83%ige bei der des doppelsträngigen Anteils. Das entspricht einer ca 90%igen Bindung der Gesamt-neureplizierten DNA, verglichen mit 92,5%iger Bindung der Kontroll-DNA (nicht an Hydroxyapatit fraktionierte DNA).

Verkleinert man die Molekülläge der DNA also um ca. das 20fache, so kann man in der neusynthetisierten, an Nitrocellulose bindenden Fraktion einsträngige Bereiche nachweisen. Aber auch dann ist die Dichteverschiebung in der isopyknischen Zentrifugation nur sehr gering, und in der Hydroxyapatit-Chromatographie wird nur ca. 1/3 der Radioaktivität im Elutionsbereich einsträngiger DNA von der Säule gewaschen. Im Gegensatz zum Hydroxyapatit differenziert die Nitrocellulose offensichtlich deutlich zwischen Molekülen, die neben überwiegend doppelsträngigen sehr kleine, einsträngige Bereiche besitzen, und solchen, die nur doppelsträngig sind.
Beruht die Bindung an Nitrocellulose auf dem Gehalt an einsträngigen Bereichen, so sollten diese aufgehoben werden können, wenn man die DNA mit einer Endonuclease behandelt, die spezifisch Einstrangbereiche abbaut. Tatsächlich sank nach Endonuclease-Behandlung der Prozentsatz der Nitrocellulose-Bindung von 92,5% auf 22%, und die Dichteverschiebung im Cs_2SO_4-Gradienten wurde aufgehoben. Die Hydroxyapatit-Chromatographie zeigte nun an der Stelle des PO_4-Gradienten, an der einsträngige DNA eluiert wird, kaum noch Aktivität, dafür erschienen aber zwei neue Gipfel in Bereichen, in denen mehr oder weniger große, durch Enzymwirkung entstandene Abbauprodukte vom Hydroxyapatit gewaschen werden (37). Es konnte somit gezeigt werden, daß die nascierende DNA in sehr geringem Maße Einstrang-Charakter besitzt, der sich erst unter hochauflösenden Versuchsbedingungen demonstrieren ließ. Entfernte man die einsträngigen Bereiche, so sank die Nitrocellulose-Affinität rapide auf 1/4 des ursprünglichen Wertes. Daß diese Einsträngigkeit nicht durch Beschallung erzeugt wurde, zeigen Ergebnisse von Doty et al. (30), sowie Colson et al. (36), die beweisen, daß Beschallung den Abbau der helikalen DNA durch Doppelstrangbrüche verursacht. Auch konnte in unserem Labor durch Beschallung niemals erhöhte Nitrocellulose-Affinität hervorgerufen werden.

Wie eingangs erwähnt, erschienen bis jetzt mehrere Veröffentlichungen, die sich mit der Funktion der RNA als "Primer" bei der DNA-Synthese beschäftigten. Bekanntlich werden RNA-DNA-Hybride von Nitrocellulose-Membranfiltern festgehalten. RNA könnte also auch einen Grund für die erhöhte Nitrocellulose-Affinität neureplizierter DNA darstellen.

Eines der Kennzeichen von einsträngigen RNA-DNA-Molekülen ist es, daß sie sich im Dichtegradienten von reiner, einsträngiger DNA trennen lassen. Da es dabei unwichtig ist, ob der RNA- oder DNA-Anteil die Markierung trägt, wurden verschieden kurze "Pulse" mit ^{3}H-Thymidin gegeben, die neusynthetisierte DNA auf die gewohnte Weise abgetrennt und im isopyknischen Gradienten mit allgemeiner Zell-DNA als Referenz untersucht. Es ergaben sich aber im Gegensatz zu Ergebnissen von Sato et al. (25) bei Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen sowohl nach Hitzedenaturierung wie auch nach Denaturierung in Formamid keine signifikanten Dichteverschiebungen.

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, daß die Wahrscheinlichkeit, "Primer"-RNA zu entdecken, mit der Kürze der gegebenen "Pulse" zunimmt, wurde ein 30 sec.-"Puls" gegeben, und die Analytik durch höhere Fraktionsanzahl und flacheren Gradienten verfeinert. Um außerdem Effekte auszuschließen, die durch die DNA-Präparation auftreten konnten, wurde die DNA nach der Methode von Paoletti wie der von Sato et al. aufgearbeitet. Aber auch hier wurde keine Differenz zur Referenz-DNA sichtbar.

Schließlich wurde noch extrem beschallte, neusynthetisierte DNA, die teils sofort, teils erst nach Alkali-Behandlung hitzedenaturiert worden war, im hochauflösenden Cs_2SO_4-Gradienten untersucht. Bei einer kovalenten RNA-DNA-Bindung müßten sich Dichteunterschiede zeigen, was jedoch nicht der Fall war.

Weitere Untersuchungen am hiesigen Institut über eine Funktion der RNA als "Primer" bei der DNA-Synthese - unter anderem mit ^{3}H-Uridin-Markierung - konnten Effekte nach-

weisen, die die Gegenwart von RNA in der über Nitrocellulose-Chromatographie gewonnenen, neusynthetisierten DNA simulieren (21).

1.) ^{3}H-Uridin ist als Vorläufer für RNA nicht vollkommen spezifisch; es kann über normale Stoffwechselwege als Desoxy-Cytidin-monophosphat in die DNA gelangen. Kinetische Studien zeigten, daß proportional zur Länge des Uridin-"Pulses" ^{3}H-Markierung in die DNA eingebaut wurde, während ein RNA-"Primer" nur bei sehr kurzen "Pulsen" entdeckt werden sollte (11,12). Im Hinblick darauf scheint die relativ lange Markierungszeit (10 min.) von Sato et al. (25) ziemlich ungünstig.

2.) Unter den gegebenen Versuchsbedingungen besteht die Möglichkeit einer Bildung von RNA-DNA-Hybriden als Artefakt, wenn DNA in relativ hoher Konzentration und genügend homologe RNA von hoher, spezifischer Radioaktivität während der Denaturierung vorliegen (21).

Nach den hier erhobenen Befunden ist RNA entweder kein Bestandteil der über Nitrocellulose-Chromatographie gewonnenen, neusynthetisierten DNA oder sie ging im Laufe der Aufarbeitung verloren, oder ihr Anteil ist so gering, daß er mit den hier angewandten Methoden nicht nachweisbar ist. Auf jeden Fall kann man RNA als Ursache für die erhöhte Nitrocellulose-Affinität neureplizierter DNA ausschließen; das heißt nicht, daß RNA keine "Primer"-Funktion bei der DNA-Synthese von Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen haben kann.

Die vorliegenden Ergebnisse führen zum Schluß, daß einsträngige Bereiche für die Nitrocellulose-Affinität nascierender DNA verantwortlich zu machen sind. Gleichzeitig ergibt sich, daß diese Bereiche sehr klein sein müssen, ähnlich, wie Joannou (34) für seine vorübergehend während der Replikation auftretenden, einsträngigen "gaps" vorschlägt. Allerdings sind sie verschieden von den größeren Einstrangbereichen, die, wie oben erwähnt (15), als Artefakte infolge der Aufarbeitung auftreten können.

Das zweite Ziel der Arbeit bestand darin, eine Aussage über die Lage des die Nitrocellulose-Affinität ver-

ursachenden Bereiches neusynthetisierter DNA relativ zum Replikationspunkt zu machen. Zur Lösung dieser Fragestellung wurde von möglichst schonend isolierter "Puls"- bzw. "Puls-Chase"-DNA der neureplizierte Anteil über Nitrocellulose abgetrennt und die Molekülgröße der DNA-Proben durch verschieden starke Scherbelastung auf s_{20w}-Werte von ca. 70, 20 und 10 eingestellt. Ausgehend von der Annahme, daß eine zu einem bestimmten Zeitpunkt in die DNA eingebaute Markierung sich im Laufe der weiteren Replikation immer weiter vom Replikationspunkt und somit vom für die Nitrocellulose-Affinität verantwortlichen Bereich entfernt, sollte der an Nitrocellulose bindende Anteil radioaktiver Markierung aus einer "Puls-Chase"-DNA durch Schereinwirkung leichter entfernt werden können, als der aus einer "Puls"-DNA. Die Ergebnisse der Nitrocellulose-Chromatographie mit verschieden stark gescherten DNA-Molekülen von "Puls"- bzw. "Puls-Chase"-DNA bestätigen die Hypothese, daß die Nitrocellulose bindenden Strukturen sehr eng mit dem Replikationspunkt vergesellschaftet oder mit ihm identisch sind.

An Nitrocellulose bindende Markierung einer "Puls-Chase"-DNA müßte also nach genügend langen "Chase"-Zeiten vollkommen entfernt werden können. Die Auswertung eines Experimentes über die Abhängigkeit des an Nitrocellulose bindenden Anteils der "Puls"-Markierung von der "Chase"-Zeit ergab eine biphasische Kinetik dieses Prozesses. Wie erwartet, ist anfangs die Abnahme des bindenden Anteils sehr groß, wird dann aber äußerst langsam. Es handelt sich hier offensichtlich nicht nur um einen Einstufenprozeß.

Nach dem heutigen Wissensstand ist es sehr unwahrscheinlich, daß in Eukaryonten ein großes DNA-Molekül mit Hilfe von nur einem Wachstumspunkt repliziert wird. Vielmehr soll die DNA-Synthese in einzelnen, voneinander unabhängigen Einheiten (Replikon) vor sich gehen, die später integriert werden. Für das "Puls-Chase"-Experiment bedeutet

das, daß während der gesamten "Puls"-Zeit (effektiv ca. 20 min.), Replikons initiiert werden können. Geht man weiterhin von der Annahme aus, daß ein Wachstumspunkt nach Erreichen des Endes eines Replikons weiterhin seine Nitrocellulose-Affinität behält, bis das Replikon integriert wird, dann hängt die Kinetik der Nitrocellulose-Affinität von DNA-Markierung, die nahe am Ende eines Replikons sitzt, mehr von der Integrationsrate des Replikons als von der Wachstumsrate der DNA ab. Diese Hypothese könnte die biphasische Kinetik erklären.
Weitere kinetische Studien über die Nitrocellulose-Affinität neusynthetisierter DNA eröffneten unserer Forschungsgruppe über ein mathematisches Modell die Möglichkeit, Aussagen über die DNA-Synthese-Geschwindigkeit und über Replikonlänge zu machen (31). Diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.

5.
Zusammenfassung

Mit Hilfe der Nitrocellulose-Chromatographie wurde aus der DNA von logarithmisch wachsenden Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen eine Fraktion replizierender DNA abgetrennt und wie folgt charakterisiert:

1.) Sie ist überwiegend doppelsträngig und enthält sehr kleine einsträngige Bereiche, die für die Nitrocellulose-Affinität verantwortlich sind.

2.) RNA ist in der über Nitrocellulose-Chromatographie abgetrennten, neureplizierten DNA nicht nachweisbar. Es konnte ausgeschlossen werden, daß RNA einen Grund für die Nitrocellulose-Bindung darstellt.

3.) Der die Nitrocellulose-Affinität verursachende Bereich steht in engem Zusammenhang mit dem Replikationspunkt bzw. ist mit ihm identisch.

Die Ergebnisse stützen neuere Modellvorstellungen über den Mechanismus der DNA-Replikation.

6.

Literatur

1. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A. (1968) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 59 : 598
2. Oishi, M. (1968) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 6o : 329
3. Oishi, M. (1968) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 6o :691
4. Boezi, I.A., Armstrong, R.L. (1967) Methofs in Enzymology XII A : 684
5. Probst, H., Ullrich, A., Krauss, G. (1971) Biochim.Biophys.Acta. 254 : 15
6. Painter, R.B. und Schäfer, T. (1969) Nature 221 : 1215
7. Berger, H und Irvin, J.L. (197o) Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 65 : 152
8. Sato, S., Ariake, S., Saito, M. und Sugimura, T. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49 : 27o
9. Lark, K.G. (1972) J.Mol.Biol. 64 : 47
1o. Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 69 : 965
11. Sugino, A., Hirose, S. und Okazaki, R. (1972) Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 69 : 1863
12. Hirose, S., Okazaki, R. und Tamanoi, F. (1973) J.Mol.Biol. 77 : 5o1
13. Magnusson, G., Pigiet, V., Winnacker, E.L. Abrams, R. und Reichard, P. (1973) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 7o : 412
14. Wagar, M.A. und Hubermann, J.A. (1973) Biochem.Biophys. Res.Commun. 51 : 174
15. Habener, I.F., Bynum, B.S. und Shack, J. (197o) J. Mol. Biol. 49 : 157
16. Paoletti, C., Dutheillet, Lamonthezie, N., Ieanteur, Ph., Obrenovich. (1967) Biochim.Biophys.Acta. 149 : 435
17. Scholz, D. Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen (1973)
18. Goulian, M. (1968) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 61 : 284
19. Kornberg, A. (1969) Science 163 : 1410
2o. Knippers, R. (1971) Nature 228 : 1550

21. Probst, H., Gentner, P., Hofstaetter, T. und Jenke, H.-S. Biochim.Biophys.Acta. 340 : 361
22. Wells, R.D., Flügel, R.M., Larson, J.E., Schendel, P.F., Sweet, R.W. (1972) Biochemistry 11 : 621
23. Karzel, K. (1965) Med.Pharmacol.Exp. 12 : 47
24. Schindler, R., Day, M., Fischer, G.A. (1958) Cancer Res. 19 : 47
25. Sato, S., Ariake, S., Saito, M. und Sugimura, T. (1972) Biochem.Biophys.Res.Commun. 49 : 827
26. Probst, H. und Jenke, H.-S. (1973) Biochem.Biophys.Res. Commun. 52 : 800
27. McEwen, C.R. (1967) Analytical Biochemistry 20 : 114
28. Lyscov, V.N. und Moshkovsky, Y.Sh. (1969) Biochim. Biophys.Acta. 190 : 101
29. Sato, S., Tanaka und Sugimura, T. (1970) Biochim.Biophys.Acta. 209 : 43
30. Doty, P., Mcgill, B.B. und Rice, S.A. (1958) Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 44 : 432
31. Probst, H., Hofstaetter, T., Jenke, H.-S. und Gentner, P. wird in Biochim.Biophys.Acta. veröffentlicht
32. Klamerth, O. (1965) Nature 208 : 1318
33. Klein, A., Bonhoeffer, F. (1972) Annual Review of Biochemistry 41 : 301
34. Joannou, P. (1973) Nature New Biology 244 : 267
35. Bernardi, G. (1969) Biochim-Biophys.Acta. 174 : 423
36. Colson, P., Houssier, C. und Frederioq, E. (1974) Biochim.Biophys.Acta, 340 : 244
37. Bernardi, G. (1968) Biochim.Biophys.Acta. 174 : 449

L e b e n s l a u f

Am 22.o8.1943 wurde ich, Hans-Stephan J e n k e , in Hindenburg (Oberschlesien) als zweites Kind des Studienrates Erich Jenke und seiner Frau Ruth-Maria geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Düren von 1950-1954 trat ich in das dortige Stiftische Gymnasium ein, an dem ich am 25.o2.1964 das Abitur ablegte. Von 1964-1966 leistete ich meinen Wehrdienst.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen, das ich 1972 mit der Diplom-Hauptprüfung beendete.

Seit Mai 1972 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Probst am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen an meiner Dissertation:"Replizierende DNA mit erhöhter Nitrocellulose-Affinität aus Ehrlich-Asciteszellen.", die ich im Sommersemester 1974 abschloß.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	: G. Weitzel, F. Schneider, H. Holzer
Anorganische Chemie	: W. Rüdorff, W. Bues
Organische Chemie	: E. Müller, E. Bayer, A. Lüttringhaus
Physikalische Chemie	: H. Mauser, G. Kortüm
Physik	: H.Krüger
Mathematik	: W. Schweizer
Anatomie	: K. Mörike, K. Hinrichsen
Botanik	: E. Bünning, H. Mohr
Zoologie	: K. Grell, V. Schwartz
Mikrobiologie	: H. Zähner, H. Diekmann
Physiologie	: F.P. Möhres, H. Metzner